



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/82, C12N 15/62, 15/86, C07K 19/00, A61K 38/16, 31/70, 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04092 (43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01111 (22) Date de dépôt international: 17 juillet 1996 (17.07.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/08729 19 juillet 1995 (19.07.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CONSEILLER, Emmanuel [FR/FR]; 10, rue de Plélo, F-75015 Paris (FR). BRACCO, Laurent [FR/FR]; 12, rue Moulin des Prés, F-75013 Paris (FR). (74) Mandataire: SAVINA, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: P53 PROTEIN VARIANTS AND THERAPEUTICAL USES THEREOF (54) Titre: VARIANTS DE LA PROTEINE P53 ET UTILISATIONS THERAPEUTIQUES (57) Abstract Proteins derived from the product of tumour suppressor gene p53 and having enhanced functions for therapeutical use are disclosed. The proteins advantageously have enhanced tumour suppressor and programmed cell death inducer functions, particularly in proliferative disease contexts where wild-type p53 protein is inactivated. Nucleic acids coding for such molecules, vectors containing same, and therapeutical uses thereof, particularly in gene therapy, are also disclosed. (57) Abrégé La présente invention concerne des protéines dérivées du produit du gène suppresseur de tumeurs p53, possédant des fonctions améliorées en vue d'une utilisation thérapeutique. Elle concerne avantageusement des protéines possédant des fonctions suppresseur de tumeurs et inducteur de mort cellulaire programmée améliorées, plus particulièrement dans des contextes pathologiques de prolifération dans lesquels la protéine p53 de type sauvage est inactivée. Elle concerne également les acides nucléiques codant pour ces molécules, les vecteurs les contenant et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

VARIANTS DE LA PROTEINE P53 ET UTILISATIONS
THERAPEUTIQUES

La présente invention concerne des protéines dérivées du produit du gène suppresseur de tumeurs p53, possédant des fonctions améliorées en vue d'une utilisation thérapeutique. Elle concerne avantageusement des protéines possédant des fonctions suppresseur de tumeurs et inducteur de mort cellulaire programmée supérieures à celle de la protéine p53 de type sauvage, plus particulièrement dans des contextes pathologiques de prolifération dans lesquels la protéine p53 de type sauvage est inactivée.

Elle concerne également les acides nucléiques codant pour ces molécules, les vecteurs les contenant et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique. Les produits de l'invention sont particulièrement adaptés à la restauration des fonctions de p53 dans des contextes pathologiques tels que notamment les cancers.

La protéine p53 sauvage intervient dans la régulation du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome de la cellule. Cette protéine, dont la fonction principale est d'être un activateur de la transcription de certains gènes, est susceptible, par un processus non encore bien défini, de bloquer la cellule en phase G1 du cycle cellulaire lors de l'apparition de mutations au cours de la réplication du génome, et d'enclencher un certains nombre de processus de réparation de l'ADN. De plus, en cas de mauvais fonctionnement de ces processus de réparation ou en cas d'apparition d'évènements mutationnels trop nombreux pour être corrigés, cette protéine est capable d'induire le phénomène de mort cellulaire programmée, appelé apoptose.

De cette façon, la protéine p53 agit comme un supresseur de tumeur, en éliminant les cellules anormalement différenciées ou dont le génome a été endommagé.

Cette principale fonction de la p53 dépend de sa fonction de facteur de transcription, soit en d'autre termes de sa double capacité à reconnaître des séquences spécifiques au niveau de l'ADN génomique et à recruter la machinerie générale de transcription.

5 La protéine p53 comporte 393 acides aminés, qui définissent 5 domaines fonctionnels (voir Figure 1) :

 - le domaine activateur de la transcription, constitué par les acides aminés 1 à 73, capable de lier certains facteurs de la machinerie générale de transcription comme la protéine TBP. Ce domaine est aussi le
10 siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles. Il est également le siège d'interactions nombreuses de la protéine p53 avec de nombreuses autres protéines et notamment avec la protéine cellulaire mdm2 ou la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr (EBV), capables de bloquer la fonction de la protéine sauvage. De plus, ce domaine possède des
15 séquences d'acides aminés dites PEST de susceptibilité à la dégradation protéolytique.

 - le domaine de liaison à l'ADN, localisé entre les acides aminés 73 et 315. La conformation de ce domaine central de p53 régule la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques de la protéine p53. Ce
20 domaine est le siège de deux types d'altérations affectant la fonction de la protéine sauvage :

 (i) l'interaction avec des protéines bloquant la fonction de la p53 comme l'antigène 'grand T' du virus SV40 ou les protéines virales E6 des virus HPV16 et HPV18 capables de provoquer sa dégradation par le système
25 de l'ubiquitine. Cette dernière interaction ne peut se faire qu'en présence de la protéine cellulaire E6ap (enzyme E3 de la cascade de l'ubiquitination).

 (ii) les mutations ponctuelles qui affectent la fonction de la p53 et dont la quasi-totalité sont localisées dans cette région.

- le signal de localisation nucléaire, constitué des acides aminés 315 à 325, indispensable au bon adressage de la protéine dans le compartiment où elle va exercer sa principale fonction.

- le domaine d'oligomérisation, constitué des acides aminés 325 à 355. Cette région 325 à 355 forme une structure de type; feuillet β (326-334)-coude (335-336)-hélice α (337-355). Les altérations de fonctions localisées dans cette région sont essentiellement dues à l'interaction de la protéine sauvage avec les différentes formes mutantes qui peuvent conduire à des effets variables sur la fonction de la protéine sauvage.

- le domaine de régulation, constitué des acides aminés 365 à 393, qui est le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations, fixation d'ARN,...) qui modulent la fonction de la protéine p53 de façon positive ou négative. Ce domaine joue un rôle extrêmement important dans la modulation de l'activité de la protéine sauvage.

Le fonctionnement de la protéine p53 peut être perturbé de différentes façons.

- blocage de sa fonction par un certain nombre de facteurs comme par exemple l'antigène 'grand T' du virus SV40, la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr, ou la protéine cellulaire mdm2.

- déstabilisation de la protéine par augmentation de sa susceptibilité à la protéolyse, notamment par interaction avec la protéine E6 des virus du papillome humain HPV16 et HPV18, qui favorise l'entrée de la p53 dans le cycle d'ubiquitination. Dans ce cas l'interaction entre ces deux protéines ne peut se faire que par la fixation préalable d'une protéine cellulaire, la protéine E6ap dont le site de fixation est mal connu.

- mutations ponctuelles au niveau du gène de la p53.

- délétion d'un ou des deux allèles de la p53

Les deux derniers types de modifications sont retrouvés dans environ 50% des différents types de cancer. A cet égard, les mutations du gène de la p53 repartitionnées dans les cellules cancéreuses touchent une très grande
5 partie du gène codant pour cette protéine, et ont pour résultats des modifications variables du fonctionnement de cette protéine. On peut cependant noter que ces mutations sont en grande majorité localisées dans la partie centrale de la protéine p53 dont on sait qu'elle est la région de contact avec les séquences génomiques spécifiques de la protéine p53.

10 Ceci explique pourquoi la plupart des mutants de la protéine p53 ont comme principale caractéristique de ne plus pouvoir se fixer aux séquences d'ADN que reconnaît la protéine sauvage et ainsi de ne plus pouvoir exercer leur rôle de facteur de transcription. Par ailleurs, certains mutants semblent avoir acquis de nouvelles fonctions telles que l'activation de certains gènes
15 au niveau transcriptionnel.

On regroupe actuellement l'ensemble de ces modifications dans trois catégories:

- les mutants dits faibles, dont le produit est une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles,
20 n'affecte pas le fonctionnement de la protéine sauvage codée par l'autre allèle. Les principaux représentants de cette catégorie sont les mutants H273 et W248, ce dernier étant spécifique du syndrome familial de Li-Fraumeni d'hypersensibilité aux affections cancéreuses.

- les mutants dominant-négatifs, dont le produit est une protéine
25 non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles et par interaction avec la protéine sauvage, est capable de bloquer le fonctionnement de celle-ci par formation d'oligomères mixtes non-actifs qui

ne peuvent plus se fixer aux séquences d'ADN spécifiques de la protéine sauvage. Le principal représentant de cette catégorie est le mutant G281.

- les mutants dominant-oncogéniques, dont le produit est une protéine qui est capable d'une part de bloquer la fonction de la protéine sauvage comme les mutants de la catégorie précédente, et d'autre part, de favoriser par des mécanismes mal connus le développement tumoral, présentant ainsi un gain de fonction. Le principal représentant de cette catégorie est le mutant H175.

Compte tenu de ses propriétés anti-tumorales et apoptotiques et de son implication dans nombreuses pathologies de type hyperprolifératives, le gène p53 sauvage a été utilisé dans des approches de thérapie génique et cellulaire. Il a en particulier été proposé de traiter certaines pathologies hyperprolifératives, et notamment des cancers, par administration in vivo du gène p53 sauvage, par restauration des fonctions de p53. L'administration peut être réalisée préférentiellement par des vecteurs viraux et notamment adénoviraux (WO94/24297) ou rétroviraux (WO94/06910).

Il a ainsi été montré que l'introduction d'un acide nucléique codant pour la protéine p53 sauvage permettait de restaurer partiellement une régulation normale de la croissance cellulaire. Cependant, si ces résultats sont encourageants, l'efficacité de ces approches est limitée par l'efficacité thérapeutique de la protéine p53 après transfert et expression in vivo dans les cellules hyperprolifératives. En effet, les situations pathologiques hyperproliférative telles que les cancers proviennent du dérèglement de l'équilibre qui s'établit dans un réseau de contrôles négatifs et positifs de la croissance cellulaire. L'inactivation du contrôle négatif exercé par la protéine p53 sauvage par l'apparition d'un mutant p53 dominant négatif à partir de l'un des deux allèles, la surexpression d'un partenaire cellulaire inactivant p53 comme par exemple mdm2, voir la présence d'un inactivateur viral suite à une infection, constituent un contexte non favorable pour une thérapie

basée sur la réintroduction d'une protéine p53 sauvage qui risque fort d'être également inactivée.

Il est donc particulièrement important de pouvoir disposer de protéines de type p53 ayant des propriétés thérapeutiques accrues. Notamment, il
5 serait particulièrement avantageux de disposer de molécules p53 actives constitutivement et non sensibles aux effets inactivateurs des mutants dominant-négatifs et oncogéniques ou d'autres protéines cellulaires ou virales telles que E6 de HPV18 et HPV16, MDM2, EBNA5 de EBV, etc rencontrés dans les cellules tumorales.

10 Certaines modifications de la protéine p53 ont été décrites dans l'art antérieur. Ainsi, la demande WO95/06661 décrit des modifications sur certains résidus des régions homologues de la protéine p53, c'est-à-dire dans les régions 343-351, 372-380 et 381-393. Cependant, ces modifications sont très mineures et ne permettent pas aux produits résultant d'échapper
15 aux mécanismes d'inactivation de la protéine p53 in vivo. De plus, ces protéines ne semblent pas présenter d'activité améliorée par rapport à la protéine p53 sauvage.

Hupp et al. (Cell Vol 71 (1992) 875) ont décrit un dérivé de p53 comprenant une délétion des 30 résidus C-terminaux (p53 Δ C-ter30).
20 Toutefois, si cette protéine conserve une capacité à lier l'ADN, ses propriétés apoptotiques ne sont pas démontrées. De plus, elle n'est pas résistante à l'inactivation par les mutants dominants négatifs.

Pietenpol et al (PNAS 91 (1994) 1998) ont décrit des molécules chimériques dérivées de la protéine p53, notamment une protéine VP16-p53
25 (80-343)-GCN4. Cependant, cette molécule possède une capacité de liaison à l'ADN et de transactivation nettement diminuées par rapport à la protéine p53 sauvage (40%). Par ailleurs, elle possède une région d'oligomérisation non sélective, risquant d'interagir avec d'autres composant cellulaires et ainsi

d'induire une réponse cellulaire non spécifique. Par ailleurs, ses propriétés de résistance aux mécanismes d'inactivation ne sont pas indiquées.

La présente invention décrit de nouveaux variants de la protéine p53 présentant des propriétés thérapeutiques améliorées. Elle décrit en particulier des variants adaptés à une utilisation en thérapie génique, notamment anti-cancéreuse. Les variants de l'invention dérivent de la protéine p53 par modification(s) structurale(s), conservent une activité de type p53 et, exprimés dans des cellules hyperprolifératives, présentent au moins une propriété accrue par rapport à la protéine p53. Il peut s'agir en particulier de l'activité anti-proliférative et/ou apoptotique. Les variants de l'invention possèdent avantageusement une activité anti-proliférative et/ou apoptotique accrue, ou plus spécifique des cellules hyperprolifératives, ou moins sensible aux différentes altérations auxquelles est sujette la p53 sauvage.

Un premier objet de l'invention concerne plus particulièrement un variant de la protéine p53 dans lequel tout ou partie du domaine d'oligomérisation est délété et remplacé par un domaine leucine zipper artificiel. Comme indiqué ci-avant, la protéine p53 est inactivée par certains mutants, et notamment les mutants dominant-négatifs et oncogéniques, rencontrés dans les cellules tumorales. Cette inactivation est le résultat de la formation d'oligomères mixtes non actifs entre la protéine p53 sauvage et le mutant, qui ne peuvent plus se fixer aux séquences spécifiques reconnues par la protéine p53 sauvage. La présente invention décrit maintenant des variants de la protéine p53 résistant à l'effet dominant négatif de certains mutants, c'est-à-dire des variants actifs dans un contexte cellulaire présentant un ou deux allèles mutés, ce qui est le cas de près de 90% des cancers humains p53 dépendants.

Dans les variants selon l'invention, tout ou partie du domaine d'oligomérisation naturel de la protéine, qui ne fait pas la distinction entre les

formes sauvage et mutante, est ainsi remplacé par un domaine équivalent possédant une capacité d'oligomérisation spécifique. Cette modification est effectuée en utilisant un leucine-zipper artificiel optimisé pour former un dimère. Les molécules selon l'invention comportant un tel leucine-zipper

5 artificiel sont particulièrement avantageuses car forment des oligomères uniquement avec d'autres molécules portant le même leucine-zipper. Elles ne forment donc pas d'oligomères avec les mutants dominant négatifs ou oncogéniques de la protéine p53, susceptibles de les inactiver. Elles ne forment pas non plus d'oligomères avec d'autres protéines cellulaires portant

10 des domaines d'oligomérisation, susceptibles également de les inactiver ou d'induire des effets indésirables. Elles ne peuvent former que des homo-oligomères et possèdent donc une sélectivité importante, assurant une meilleure activité dans un contexte de pathologie hyperproliférative.

Selon la présente invention, le domaine leucine zipper artificiel est

15 donc avantageusement un domaine non présent à l'état naturel, assurant une sélectivité d'oligomérisation. Tout préférentiellement, le domaine d'oligomérisation est représenté par la séquence SEQ ID n° 1.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les variants comportent une délétion de tout ou partie du domaine d'oligomérisation et de

20 tout ou partie du domaine de régulation. Comme indiqué précédemment, le domaine d'oligomérisation est localisé entre les résidus 325-355 inclus et le domaine de régulation entre les résidus 365-393 inclus. Ce type de variant est tout à fait avantageux car est dépourvu de tout ou partie des effets de régulation négative exercée par l'intermédiaire de la partie C-terminale (aa

25 365-393). Ces variants constituent des protéines potentiellement constitutivement actives, présentant une activité non modulable et éventuellement accrue. La région de régulation est avantageusement supprimée dans sa totalité. Les variants préférés selon l'invention comportent une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu

30 326 ou 337 inclus.

Des exemples d'intermédiaires utilisés pour la construction de ces variants sont notamment :

5 . pEC107 (75-325-lz) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

. pEC110 (75-336-lz) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, dans les variants de l'invention, le résidu cystéine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidine. Cette mutation permet avantageusement d'augmenter l'affinité du variant pour les séquences nucléotidiques spécifiques de liaison. L'introduction de cette modification supplémentaire permet donc d'obtenir une molécule ayant en plus un potentiel transactivateur augmenté.

15 Des exemples précis de constructions intermédiaires pour la préparation de variants selon l'invention combinant ces différentes modifications sont notamment :

20 pEC139 (75-325(H182)-lz) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1, et une histidine en position 182.

25 pEC140 (75-336(H182)-lz) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1, et une histidine en position 182.

Avantageusement, dans les variants selon l'invention, tout ou partie du domaine transactivateur est également délété et remplacé par un domaine

transactivateur hétérologue. Il a été indiqué ci-avant que les fonctions transactivatrices de p53 sont essentielles à son activité de suppresseur de tumeur ou d'inducteur d'apoptose. De manière à augmenter le potentiel thérapeutique des variants selon l'invention, il est particulièrement
5 avantageux de substituer le domaine transactivateur naturel par un domaine transactivateur hétérologue puissant. Ces variants présentent ainsi de nombreux avantages. Ils possèdent bien entendu une activité transactivateur élevée. Mais ils sont également rendus insensibles aux effets de régulation négative exercés par l'intermédiaire de la partie N-terminale (aa 1-73). En
10 effet cette région contient les séquences PEST responsables de sa dégradation protéolytique. La substitution de cette région par un domaine transactivateur hétérologue dépourvu de séquences PEST permet de diminuer cette régulation négative. Ces variants sont également caractérisés par la diminution, voire la suppression, de toute interaction avec la protéine
15 E6 du virus du papillome humain (HPV) qui est susceptible d'induire leur dégradation. Ils sont également moins sensibles aux interactions avec d'autres protéines cellulaires telles que MDM2 et EBNA qui affectent l'activité de la protéine p53 sauvage. Les variants ainsi obtenus possèdent donc une stabilité accrue. La suppression des domaines sensibles à une régulation
20 négative (domaines régulateur et transactivateur) conduit de manière particulièrement avantageuse à des molécules qui ne sont plus la cible de protéines induisant leur protéolyse ou leur inactivation.

Avantageusement, dans les variants de l'invention, le domaine transactivateur est supprimé par délétion des résidus 1 à 74. Les
25 constructions intermédiaires utilisées pour la réalisation de telles molécules sont notamment pEC107 (75-325-lz), pEC110 (75-336-lz), pEC139 (75-325(H182)-lz) et pEC140 (75-336(H182)-lz).

Selon un premier mode de réalisation, le domaine transactivateur hétérologue est le domaine transactivateur de VP16. Il est avantageusement
30 constitué des résidus 411 à 490 de VP16, dont la séquence est donnée

SEQ ID n° 2. Des exemples précis de variants selon l'invention combinant ces différents modifications sont notamment :

5 ⇒ pEC114 (VP16-75-325-lz) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2 et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1. La séquence complète du variant pEC114 est représentée SEQ ID n° 25.

10 ⇒ pEC116 (VP16-75-336-lz) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2 et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1. La séquence complète du variant pEC116 est représentée SEQ ID n° 26.

15 ⇒ pEC147 (VP16-75-325(H182)-lz) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2; une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ
20 ID n°1, et une histidine en position 182.

 ⇒ pEC149 (VP16-75-336(H182)-lz) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2; une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu
25 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1, et une histidine en position 182.

En raison des modifications mentionnées ci-avant, les variants de l'invention ont également des propriétés 'tueuses' que sont l'arrêt du cycle

cellulaire et l'apoptose potentiellement améliorées. La combinaison des modifications mentionnées, incluant la présence d'un domaine d'oligomérisation sélectif et un pouvoir transactivateur amélioré par substitution du domaine d'origine et par la présence d'une histidine en 182

5 confèrent en effet aux variants de l'invention des potentialités thérapeutiques nettement améliorées. En outre, les variants selon l'invention permettent d'éviter l'apparition de certains mutants (dominants oncogéniques). Les gains de fonction de certains mutants de p53 sont encore mal définis tant au niveau de leur mécanismes qu'au niveau des domaines de la protéine p53

10 impliqués. Il est fort probable que certaines de ces nouvelles fonctions vont dépendre de l'association à certains partenaires cellulaires effecteurs. L'élimination des domaines impliqués dans ces interactions, et dont les propriétés transformantes ont été mises en évidence, au sein des molécules décrites dans la présente demande sont de nature à empêcher l'apparition

15 de ces gains de fonctions oncogéniques. Ainsi les mutations qui apparaîtraient de façon aléatoire lors de la préparation des lots cliniques de plasmides codant pour les polypeptides décrits ou lors de la production de lots cliniques de vecteurs viraux ou chimiques codant pour ces mêmes polypeptides ne créeraient pas une sous-population de molécules

20 oncogéniques.

Par ailleurs, en raison de la suppression de certains domaines de p53 indispensables pour la fixation de certaines molécules inhibitrices de sa fonction, les variants de l'invention présentent également une activité thérapeutique plus élevée et plus stable. Finalement, l'existence de motifs

25 étrangers dans les différentes constructions de l'invention (protéine AS murine par exemple, domaine d'oligomérisation artificiel, etc) est susceptible de déclencher une réaction immunitaire lors de la mort des cellules transfectées et du relargage dans le milieu extracellulaire des ces différents fragments, augmentant ainsi la capacité du système immunitaire à lutter

30 contre les cellules tumorales.

Selon un autre mode de réalisation, le domaine transactivateur hétérologue est un domaine transactivateur actif préférentiellement dans les cellules transformées et non dans les cellules saines avoisinantes. La présente invention décrit en effet également des molécules dont la fonction s'exerce essentiellement dans des cellules transformées et non dans les cellules saines avoisinantes. Bien qu'il semble que l'expression exogène d'une p53 sauvage au sein d'une cellule différenciée comportant de la p53 sauvage endogène ait peu ou pas d'effet sur la viabilité, il est néanmoins avantageux de pouvoir disposer d'une protéine qui ne serait fonctionnelle qu'au sein de la cellule ciblée. Cette spécificité de la cellule tumorale versus la cellule normale est actuellement beaucoup travaillée au niveau de la spécificité du ciblage du vecteur viral ou de la conception de systèmes d'expression spécifiques. La présente invention décrit maintenant des dérivés de p53 dont un des domaines fonctionnels est éteint en l'absence d'un activateur cellulaire présent essentiellement dans les cellules transformées.

Ainsi, un autre objet de l'invention concerne un variant de la protéine p53 actif préférentiellement dans les cellules transformées, dans lequel un au moins des domaines fonctionnels de p53 est délété en tout ou en partie et est substitué par un domaine hétérologue actif préférentiellement dans les cellules transformées. Préférentiellement, le domaine fonctionnel de p53 concerné est le domaine transactivateur. Ainsi, un objet particulièrement préféré de l'invention concerne un variant de la protéine p53 actif préférentiellement dans les cellules transformées, dans lequel le domaine transactivateur naturel est délété en tout ou en partie et est substitué par un domaine transactivateur actif préférentiellement dans les cellules transformées. Avantageusement, le domaine transactivateur naturel est délété par suppression des résidus 1-74 inclus de p53.

L'invention concerne plus particulièrement des variants de p53 qui sont fonctionnels spécifiquement en présence d'une protéine Ras

oncogénique ou d'un mutant de p53. Ces molécules sont obtenues notamment par remplacement du domaine transactivateur de la protéine p53 sauvage par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.

Le domaine protéique capable de lier spécifiquement le transactivateur transcriptionnel ou le complexe transactivateur transcriptionnel présent dans les molécules de l'invention peut être de différents types. Il peut s'agir en particulier d'un domaine d'oligomérisation dans le cas où le transactivateur ou le complexe transactivateur ciblé comporte également un tel domaine. Il peut également s'agir de tout domaine synthétique ou naturel connu pour interagir avec ledit transactivateur ou complexe transactivateur. Il peut encore s'agir d'un anticorps ou d'un fragment ou dérivé d'un anticorps dirigé contre le transactivateur ou complexe transactivateur.

Avantageusement, le domaine hétérologue est constitué par un anticorps ou un fragment ou dérivé d'anticorps. Les fragments ou dérivés d'anticorps sont par exemple les fragments Fab ou F(ab)'₂, les régions VH ou VL d'un anticorps ou encore des anticorps simple chaîne (ScFv) comprenant une région VH liée à une région VL par un bras. La construction de séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps modifiés selon l'invention a été décrite par exemple dans le brevet US4,946,778 ou dans les demandes WO94/02610, WO94/29446.

Une construction préférée selon la présente invention comprend un ScFv dirigé contre un mutant de la protéine p53. Ces mutants apparaissent dans les cellules transformées et possèdent un domaine transactivateur. Leur recrutement par un variant selon l'invention crée une molécule chimère active sélectivement dans les cellules transformées.

Selon un autre mode préféré, le ScFv est dirigé contre un complexe transactivateur, c'est à dire un complexe entre une molécule cible présente sélectivement dans les cellules transformées, mais dépourvue d'activité transactivateur transcriptionnel (par exemple un ras oncogénique), et une
5 molécule portant un domaine transactivateur. Cette dernière comporte avantageusement un domaine transactivateur et un domaine de liaison sélectif à ladite molécule cellulaire (par exemple un ScFv anti-ras). La fixation de cette molécule permet la formation d'un complexe binaire transactivateur transcriptionnel, lequel complexe étant alors recruté par le
10 variant de l'invention.

Tout autre type de modification conduisant à cette spécificité d'activité peut bien entendu être utilisée dans le cadre de la présente invention, telle que notamment tout domaine transactivateur spécifique d'un type de cellule.

Ces variants sélectifs comportent avantageusement des modifications
15 supplémentaires dans la partie C-terminale comme indiqué ci-avant pour améliorer encore leurs propriétés. Ainsi, ils comportent avantageusement une délétion de tout ou partie du domaine d'oligomérisation, qui peut être remplacé par tout domaine d'oligomérisation hétérologue. Il s'agit plus préférentiellement d'un domaine d'oligomérisation artificiel, tel que défini ci-
20 avant.

Des exemples précis de variants selon l'invention actifs préférentiellement dans les cellules transformées sont notamment :

ScFv.antip53*-75-325-lz, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un
25 domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée, et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

ScFv.antip53*-75-325(H182)-Iz, comprenant en plus une mutation His182.

5 ScFv.antip53*-75-336-Iz, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée, et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

10 ScFv.antip53*-75-336(H182)-Iz, comprenant en plus une mutation His182.

- ScFv.antip53*-75-393, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée.

15 - ScFv.antip53*-75-393(H182), comprenant en plus une histidine en position 182.

20 - ScFv.antip53*-75-367, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée; et une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 368.

- ScFv.antip53*-75-367(H182), comprenant en plus une histidine en position 182,

25 - ScFv.antip53*-75-AS, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée; et une délétion de la partie C-

terminale, à partir du résidu 367, additionnée des 19 acides aminés de séquence SEQ ID n° 3.

- ScFv.antip53*-75-AS(H182), comprenant en plus une histidine en position 182,

5 En outre, le terme actif préférentiellement indique que ces variants exercent leur activité essentiellement lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules transformées. Une activité résiduelle peut toutefois exister dans les cellules non transformées, mais inférieure à celle observée dans les cellules transformées.

10 Un autre objet de la présente invention concerne un variant de la protéine p53 comprenant une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 367, fusionné à la séquence SEQ ID n° 3 (AS). Cette séquence correspond aux 19 derniers acides aminés du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine. Ce variant présente donc une modification du
15 domaine d'oligomérisation basée sur une protéine décrite chez la souris comme un variant d'épissage alternatif de la protéine sauvage dans laquelle les 27 acides aminés C-terminaux sont remplacés par 19 acides aminés différents. Ce variant possède une affinité pour les séquences spécifique de liaison à l'ADN potentiellement accrue.

20 Ce variant comporte avantageusement des modification dans la partie N-terminale comme indiqué ci-avant pour améliorer encore ses propriétés. Ainsi, il comporte avantageusement une délétion de tout ou partie du domaine transactivateur, qui peut être remplacé par tout domaine transactivateur hétérologue. Il s'agit plus préférentiellement du domaine
25 transactivateur dérivé de la protéine VP16 ou d'un domaine protéique capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée. En outre, le résidu 182 de la protéine p53 est avantageusement remplacé par une histidine.

Des exemples précis de ce type de variants selon l'invention sont notamment :

. ScFv.antip53*-75-AS, décrit ci-avant,

5 . pEC143 (VP16-75-AS), possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2; et une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 367, additionnée des 19 acides aminés de séquence SEQ ID n° 3. La séquence complète du variant pEC143 est représentée SEQ ID n° 28.

10 . ScFv.antip53*-75-AS(H182), décrit ci-avant,

. pEC153 (VP16-75-AS(H182)), correspond à pEC143 avec une histidine en position 182.

Selon une manière plus générale, l'invention concerne toute protéine chimère comprenant un domaine transactivateur, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine d'adressage au noyau et un domaine d'oligomérisation, dans laquelle les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 325 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 4). La demanderesse a en effet montré que cette région de la protéine p53, couplée à des domaines transactivateur et d'oligomérisation appropriés, permet la création de molécules de type p53 ayant des propriétés particulièrement avantageuses en terme de stabilité, de résistance aux effets négatifs des mutants de p53 et de sensibilité à l'inactivation par certains facteurs cellulaires.

Selon une variante, les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 336 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 5).

Les protéines chimères selon l'invention peuvent comporter différents types de domaines transactivateur. Il peut s'agir du domaine transactivateur de la protéine p53. Préférentiellement, il s'agit d'un domaine transactivateur hétérologue, choisi par exemple parmi le domaine transactivateur de VP16
5 ou un domaine protéique capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.

Concernant le domaine d'oligomérisation, il s'agit préférentiellement d'un domaine artificiel, et donc spécifique, tel que par exemple un leucine zipper artificiel, en particulier de séquence SEQ ID n° 1.

10 Les protéines chimères selon l'invention peuvent en outre comporter un résidu histidine en position 182.

Des exemples précis de protéines chimères telles que décrites dans la présente demande sont notamment pEC114, pEC116, pEC147 et pEC149.

La présente invention a également pour objet tout acide nucléique
15 codant pour un variant ou une protéine chimère tel que défini ci-avant.

L'acide nucléique selon l'invention peut être un acide ribonucléique (ARN) ou désoxyribonucléique (ADN). En outre, il peut s'agir d'un ADN complémentaire (ADNc) éventuellement comprenant un ou plusieurs introns du gène p53. Il peut être d'origine humaine, animale, virale,
20 synthétique ou semi-synthétique. Il peut être obtenu de différentes manières et notamment par synthèse chimique en utilisant les séquences présentées dans la demande et par exemple un synthétiseur d'acides nucléiques. Il peut également être obtenu par criblage de banques au moyen de sondes spécifiques, notamment telles que décrites dans la
25 demande. Il peut encore être obtenu par des techniques mixtes incluant la modification chimique (élongation, délétion, substitution, etc) de séquences criblées à partir de banques. D'une manière générale, les

acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés selon toute technique connue de l'homme du métier.

Préférentiellement, l'acide nucléique selon l'invention est un ADNc ou un ARN.

5 L'acide nucléique selon l'invention est avantageusement choisi parmi :

(a) tout ou partie des séquences SEQ ID n° 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33 et 34 ou de leur brin complémentaire,

10 (b) toute séquence hybridant avec les séquences (a) et codant pour un dérivé selon l'invention,

(c) les variants de (a) et (b) résultant de la dégénérescence du code génétique.

Comme indiqué précédemment, la demanderesse a maintenant construit de nouvelles séquences d'acide nucléique codant pour des
15 polypeptides variants de p53, ayant des propriétés antiprolifératives et apoptotiques tout à fait remarquables. Ces acides nucléiques peuvent être utilisés comme agents thérapeutiques pour produire dans les cellules des dérivés selon l'invention capables de détruire ou de corriger des dysfonctionnements cellulaires. A cet effet, la présente invention concerne
20 également toute cassette d'expression comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription. Le promoteur est avantageusement choisi parmi les promoteurs fonctionnels dans les cellules mammifères, de préférence humaines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un promoteur
25 permettant l'expression d'un acide nucléique dans une cellule hyperproliférative (cancéreuse, resténose, etc). A cet égard, différents promoteurs peuvent être utilisés. Il peut s'agir par exemple du propre

promoteur du gène p53. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Il peut ainsi s'agir de tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. On peut citer notamment les séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline, etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoA1, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, α -actine du muscle lisse, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

La présente invention fournit maintenant de nouveaux agents thérapeutiques permettant, par leurs propriétés antiprolifératives et/ou apoptotiques d'interférer avec de nombreux dysfonctionnements cellulaires. Dans ce but, les acides nucléiques ou cassettes selon l'invention peuvent être injectés tels quels au niveau du site à traiter, ou incubés directement avec les cellules à détruire ou traiter. Il a en effet été décrit que les acides nucléiques nus pouvaient pénétrer dans les cellules sans vecteur particulier. Néanmoins, on préfère dans le cadre de la

présente invention utiliser un vecteur d'administration, permettant d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage (iii) la stabilité extra- et intracellulaires.

5 Dans un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de la présente invention l'acide nucléique ou la cassette est incorporé dans un vecteur. Le vecteur utilisé peut être d'origine chimique (liposome, nanoparticule, complexe peptidique, lipides ou polymères cationiques, etc) virale (rétrovirus, Adénovirus, virus de l'herpès, AAV, virus de la vaccine, etc) ou plasmidique.

10 L'utilisation de vecteurs viraux repose sur les propriétés naturelles de transfection des virus. Il est ainsi possible d'utiliser par exemple les adénovirus, les herpès virus, les rétrovirus et les virus adéno associés. Ces vecteurs s'avèrent particulièrement performants sur le plan de la transfection. A cet égard, un objet préféré selon l'invention réside dans un
15 rétrovirus recombinant défectif dont le génome comprend un acide nucléique tel que défini ci-avant. Un autre objet particulier de l'invention réside dans un adénovirus recombinant défectif dont le génome comprend un acide nucléique tel que défini ci-avant.

20 Le vecteur selon l'invention peut également être un agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes. Les vecteurs chimiques ou biochimiques, synthétiques ou naturels, représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de
25 l'ADN à transfecter. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transfecter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la

nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques.

L'acide nucléique ou le vecteur utilisé dans la présente invention peut être formulé en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, l'acide nucléique ou le vecteur est utilisé sous une forme injectable. Il peut donc être mélangé à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Une injection directe de l'acide nucléique dans la tumeur du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses d'acide nucléique utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du gène, du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

L'invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins un acide nucléique tel que défini ci-avant.

Elle concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur tel que défini ci-avant.

Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant au moins un variant de p53 tel que défini ci-avant.

En raison de leurs propriétés antiprolifératives, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont tout particulièrement adaptées pour le traitement des désordres hyperprolifératifs, tels que notamment les

cancers et la resténose. La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace pour la destruction de cellules, notamment de cellules hyperprolifératives. Elle peut être utilisée in vitro ou ex vivo. Ex vivo, elle consiste essentiellement à incuber les cellules en présence d'un
5 ou plusieurs acides nucléiques (ou d'un vecteur, ou cassette ou directement du dérivé). In vivo, elle consiste à administrer à l'organisme une quantité active d'un vecteur (ou d'une cassette) selon l'invention, de préférence directement au niveau du site à traiter (tumeur notamment). A cet égard, l'invention a également pour objet une méthode de destruction
10 de cellules hyperprolifératives comprenant la mise en contact desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec un acide nucléique tel que défini ci-avant.

La présente invention est avantageusement utilisée in vivo pour la destruction de cellules en hyperprolifération (i.e. en prolifération
15 anormale). Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales ou des cellules de muscle lisse de la paroi vasculaire (resténose). Elle est tout particulièrement appropriée au traitement des cancers dans lesquels un mutant de p53 est observé. A titre d'exemple, on peut citer les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du
20 poumon, les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers des os, de la peau, du pancréas ou encore les cancers du rein et de la prostate, les
25 cancers de l'oesophage, les cancers du larynx, les cancers tête et cou, les cancers ano-génitaux HPV positifs, les cancers du nasopharynx EBV positifs, les cancers dans lesquels la protéine cellulaire mdm2 est surexprimée, etc.

Les variants de l'invention sont particulièrement efficaces pour le
30 traitement des cancers dans lesquels la protéine MDM2 est en outre

surexprimée, ainsi que des cancers liés au virus HPV tels que les cancers ano-génitaux HPV positifs.

La présente invention est décrite plus en détail dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 **Légende des Figures**

Figure 1 : Domaines fonctionnels de la protéine p53 sauvage. TA : Domaine activateur de la transcription; DNB : domaine de liaison à l'ADN; NLS : signal de localisation nucléaire; OL : domaine d'oligomérisation; REG : domaine de régulation.

10 Figure 2 : Construction d'un ADNc codant pour la forme AS de la p53.

Figure 3 : Clonage des ADNc codant pour les constructions pEC104, pEC106, pEC131, pEC132 et pEC133 et pour leur variant H182.

Figure 4 : Construction des variants pEC107, pEC110, pEC139 et pEC140 par fusion avec le domaine d'oligomérisation artificiel.

15 Figure 5 : Construction des variants pEC114, pEC116, pEC141, pEC143, pEC145, pEC147, pEC149, pEC151, pEC153 et pEC155.

Figure 6 : Reconnaissance de séquences d'ADN double brin spécifiques par les molécules hybrides de l'invention.

Expérience de retard sur gel: compétition entre HisV325 et p53 sauvage.
20 colonne 1: incubation en l'absence de HisV325 et p53 sauvage, colonne 2:
30 ng p53 sauvage, colonne 3: idem 2 + pAb421, colonne 4: 30 ng HisV325,
colonne 5: idem 4 + pAb421, colonne 6: 30 ng HisV325 + 30 ng p53
sauvage, colonne 7: idem 6 + pAb421, colonne 8: 30 ng HisV325 + 15 ng
p53 sauvage, colonne 9: idem 8 + pAb421, colonne 10: 30 ng HisV325 + 7.5
25 ng p53 sauvage, colonne 11: idem 10 + pAb421, colonne 12: 30 ng HisV325

+ 4.5 ng p53 sauvage, colonne 13: idem 12 + pAb421, colonne 14: 30 ng HisV325 + 3 ng p53 sauvage, colonne 15: idem 14 + pAb421

Figure 7 : Activité transactivatrice de la protéine p53 sauvage et des variants AS, V-325 et V-336.

5 Figure 8 : Activité transactivatrice de la protéine p53 sauvage et des variants V-325, V-336 et V-343.

Figure 9 : Expression des variants de l'invention dans les cellules SAOS-2

10 Figure 10 : Induction des gènes hdm2 et WAF1 dans les cellules EB, EB-1 et EB-V325

Figure 11 : Effet de la protéine E6 sur la fonction transactivatrice de la protéine p53 et des variants de l'invention dans les cellules SAOS-2. Quantité des vecteurs CMV-construction = 100ng

15 Figure 12 : Effet de la protéine E6 sur la fonction transactivatrice de la protéine p53 et des variants de l'invention dans les cellules HeLa.

Figure 13: Sensibilité de la protéine p53 sauvage et des variants de l'invention à la dégradation induite par la protéine E6.

20 Figure 14 : Effet du mutant dominant-négatif de p53 H175 sur la fonction transactivatrice des variants de l'invention. Quantité des vecteurs CMV-construction = 100ng

Figure 15 : Effet de la protéine hdm2 sur la fonction transactivatrice de la protéine p53 et des variants de l'invention dans les cellules SAOS-2. Quantité des vecteurs CMV-construction = 100ng

25 Figure 16 : Effet des protéines p53 sauvage et V-325 sur la croissance de cellules surexprimant la protéine hdm2.

Figure 17 : Induction de l'apoptose par les protéines p53 sauvage et V-325.

Figure 18 : Cinétique d'induction de l'apoptose dans les cellules EB, EB-1 et EB-V325

5 **Exemples**

Exemple A. Construction de différents fragments nucléotidiques nécessaires à la réalisation des gènes codant pour les variants de la protéine p53

A1. Construction du cDNA codant pour la p53 sauvage humaine

- 10 Le gène de la p53 humaine a été cloné par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur de l'ADN d'une banque de placenta humain (Clontech) en utilisant les oligonucléotides 5'-1 et 3'-393.

Oligonucléotide 5'-1 (SEQ ID n° 6) :
ATGGAGGAGCCGCAG

- 15 Oligonucléotide 3'-393 (SEQ ID n° 7) :
GGCGGCCGCGATATCGATTCATCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC

Ce produit a ensuite été cloné directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogène).

A2 - Construction d'un ADNc codant pour la forme AS de la p53

- 20 La forme AS de la p53 comprend un fragment codant pour les acides aminés 1 à 366 de la protéine p53 humaine additionné des 19 derniers acides aminés du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine.

La forme AS de la p53 a été obtenue en deux étapes:

- amplification par PCR d'un fragment codant pour les acides aminés 1 à 367 de la protéine p53 en utilisant les oligonucléotides 5'-1 (Cf exemple A1) et 3'-367.

Oligonucléotide 3'-367 (SEQ ID n° 8) :

5 GGCGGCCGCGATATCGATTCATCAGCTCGAGTGAGC

Le fragment PCR ainsi obtenu a ensuite été cloné dans le vecteur pCRII (Invitrogène). Le fragment ainsi cloné possède un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction Xho I (fragment 1-367).

10 - les oligonucléotides 5'-AS1, 5'-AS2, 3'-AS1 et 3'-AS2 ont été phosphorylés puis hybridés ensemble pour constituer le fragment codant pour les 19 derniers acides aminés du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine.

5'-AS1 (SEQ ID n° 9) :

TCGAGCCTGCAGCCTAGAGCCTTCCAAGCCCTCATGAAGGAGG

15 5'-AS2 (SEQ ID n° 10) :

AAAGCCCAAAGTCTGATGAATCGATATCGC

3'-AS1 (SEQ ID n° 11) :

TGAGGGCTTGGAAGGCTCTAGGCTGCAGGC

3'-AS2 (SEQ ID n° 12) :

20 GGCCGCGATATCGATTCATCAGCAGTTTGGGCTTTCCTCCTTCA

Ce fragment a ensuite été inséré au niveau du site Xho I du fragment 1-367 (voir figure 2). Le gène ainsi construit code pour le variant humain du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine (AS).

La séquence protéique ainsi modifiée est la suivante:

```

          364      367                                     386
393
5  I          I          I
    p53:- A H S S H L K S K K G Q S T S R H K K L M F K T E G P D
    S D Z
    AS: - A H S S L Q P R A F Q A L M K E E S P N C Z Z
    367:- A H S S Z Z

```

- 10 A3 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments de la protéine p53 portant le domaine de liaison à l'ADN.

15 Cet exemple décrit la construction de différents ADNc codant pour différents fragments de la protéine p53 humaine, portant tout ou partie du domaine de liaison à l'ADN de p53. Ces fragments sont ensuite utilisés dans la construction des variants de p53. Ces fragments ont été obtenus par réaction d'amplification par la polymérase sur les matrices décrites dans les exemples A1 et A2 au moyen de différents oligonucléotides. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions décrites dans l'exemple A4.1.

- 20 A3.1 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-325 de p53 et de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 325 de la protéine p53 humaine sauvage (75-325).

- 25 Cet ADNc a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1) avec les oligonucléotides 5'-75 et 3'-325 suivants :

5'-75 (SEQ ID n° 13) :

GGGAAGCTTGGGCCGGGTTCGACCTGCACCAGCAGCTCCT

3'-325 (SEQ ID n° 14) :

GGCGGCCGCGGATCCCCATCCAGTGGTTTCTT

Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu
5 par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 de séquence :

Oligonucléotide H182 3' (SEQ ID n° 15) :

ATCTGAATGGCGCTC

Ce fragment a été désigné 75-325(H182).

10 A3.2 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-336 de p53 et de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 336 de la protéine p53 humaine sauvage (75-336).

Cet ADNc a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR)
15 sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1) avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n° 13) et 3'-336 suivant :

3'-336 (SEQ ID n° 16) :

GGCGGCCGCGGATCCTCACGCCCACGGATCTG

Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide
20 aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-336(H182).

A3.3 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-343 de p53

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 343 de la protéine p53 humaine sauvage (75-343).

Cet ADNc a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1) avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n°13) et 3'-343 suivant :

3'-343 (SEQ ID n° 35) :

CGGATCCTCTCGGAACATCTCGAA

A3.4 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-367 de p53 et de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 367 de la protéine p53 humaine sauvage (75-367).

Ce fragment a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 décrit dans l'exemple A1 avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n° 13) et 3'-367 (SEQ ID n° 8).

Le fragment ainsi obtenu inclut un site de reconnaissance par l'endonucléase XhoI (75-367).

Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-367(H182).

A3.5 - Construction d'un ADNc codant pour le fragment 75-AS et de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 366 de la protéine p53 humaine sauvage (75-366) additionné des 19 derniers acides aminés du produit de splicing alternatif de la protéine p53 murine.

- 5 Ce fragment a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN du fragment AS décrit dans l'exemple A2 avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n° 13) et 3'-AS2 (SEQ ID n°12).

- 10 Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-AS(H182).

A3.6 - Construction d'un ADNc codant pour le fragment 75-393 de p53 et de son dérivé H182

- 15 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 393 de la protéine p53 humaine (75-393). Ce fragment a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN p53 décrit dans l'exemple A1 avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n° 13) et 3'-393 (SEQ ID n° 7).

- 20 Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-393(H182).

- 25 A4 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments portant un domaine activateur de la transcription (domaine transactivateur).

Cet exemple décrit la construction de différents ADNc codant pour différents fragments portant un domaine transactivateur. Ces fragments sont ensuite utilisés dans la construction des variants de p53.

A4.1 - Réactions de PCR

5 Les différents fragments ont été obtenus par réaction d'amplification par la polymérase sur différentes matrices au moyen de différents oligonucléotides. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions suivantes : Enzyme Amplitaq DNA polymerase (Perkin-Elmer) dans le tampon fourni par le fournisseur, avec une concentration de dNTP de
10 0,2 mM, 100 ng de matrice et 500 ng de chacun des deux oligonucléotides.

- cycle: 2 min à 91°C
- cycles: 1 min à 91°C
1 min à 55°C
1 min à 72°C
15 - cycle: 5 min à 72°C

A4.2 - Construction d'un ADNc codant pour la région 411-490 de la protéine virale VP16 (VP16 TA)

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 411-490 de la protéine virale VP16 (VP16 TA). Cette région porte le
20 domaine transactivateur de cette protéine.

Le fragment transactivateur dérivé de la protéine virale VP16 (411-490) du virus de l'herpès simplex a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) en utilisant les conditions précédemment définies (Cf A4.1) et les oligonucléotides 5'-VP16 et 3'-VP16 suivants:

25 5'-VP16 (SEQ ID n° 17):

AAGCTTGAATTCGTTAACATGTCCACGGCCCCCCCCGACC

3'-VP16 (SEQ ID n° 18) :

GGTCGACCACCGTACTCGTCAAT

et 100 ng du plasmide pUHD15-1 (Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5547)

- 5 Le fragment ainsi obtenu comprend 334 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 2. Il comprend dans sa partie N-terminale un résidu méthionine apporté par le site d'initiation de la transcription (ATG), ajouté lors de l'étape de clonage par PCR.

- 10 A4.2 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments capables de recruter le domaine activateur de la transcription (domaine transactivateur) d'une protéine p53 endogène.

A4.2.1 - Construction d'un ADNc codant pour un anticorps simple chaîne capable de lier la protéine p53 (ScFv 421)

- 15 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour un anticorps simple chaîne capable de lier la protéine p53 (ScFv 421). Cette construction exprimée au niveau intracellulaire, doit être capable de fixer une protéine p53 endogène sauvage ou mutante pour recruter son domaine transactivateur.

- 20 Le cDNA codant pour le ScFv 421 (demande de brevet PCT/FR96/00477) peut-être extrait sous la forme d'un fragment Nco I / Not I qui comprend un site d'initiation de la traduction (ATG) et aucune séquence d'arrêt de la traduction.

Le fragment ainsi obtenu comprend 766 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 36.

- 25 A4.2.2 - Construction d'un ADNc codant pour la région 325-360 de la protéine p53 sauvage (325-360)

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 325-360 de la protéine p53 sauvage (325-360). Cette région porte le domaine d'oligomérisation de cette protéine. Cette construction exprimée au niveau intracellulaire, doit être capable de fixer une protéine p53 endogène sauvage ou mutante pour recruter son domaine transactivateur.

Ce domaine d'oligomérisation dérivé de la protéine p53 sauvage humaine (325-360) a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) en utilisant les conditions précédemment définies (Cf A4.1) et les oligonucléotides 5'-325 et 3'-360 suivants:

10 5'-325 (SEQ ID n° 37):

AAGCTTGAATTCGTTAACGCCACCATGGGAGAATATTTAC
CCTT

3'-360 (SEQ ID n° 38) :

GGGTCGACCTGGCTCCTTCCCAGC

15 sur 100 ng de l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1).

Le fragment ainsi obtenu comprend 141 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 39. Il comprend dans sa partie N-terminale un résidu méthionine apporté par le site d'initiation de la traduction (ATG), ajouté lors de l'étape de clonage par PCR et aucune séquence d'arrêt de la traduction.

A4.2.3 - Construction d'un ADNc codant pour la région 325-393 de la protéine p53 sauvage (325-393)

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 325-393 de la protéine p53 sauvage (325-393). Cette région porte le domaine d'oligomérisation de cette protéine. Cette construction exprimée au niveau intracellulaire, doit être capable de fixer une protéine p53 endogène sauvage ou mutante pour recruter son domaine transactivateur.

Ce domaine d'oligomérisation dérivé de la protéine p53 sauvage humaine (325-360) a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) en utilisant les conditions précédemment définies (Cf A4.1) et les oligonucléotides 5'-325 (SEQ ID n° 37) et 3'-393.2 suivant:

5 3'-393.2 (SEQ ID n° 40) :

GGGTCGACCGTCTGAGTCAGGCCCTTC

sur 100 ng de l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1).

10 Le fragment ainsi obtenu comprend 243 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 41. Il comprend dans sa partie N-terminale un résidu méthionine apporté par le site d'initiation de la traduction (ATG), ajouté lors de l'étape de clonage par PCR et aucune séquence d'arrêt de la traduction.

A5 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments portant un domaine d'oligomérisation.

15 Cet exemple décrit la construction de différents ADNc codant pour différents fragments portant un domaine d'oligomérisation. Ces fragments sont ensuite utilisés dans la construction des variants de p53. Ces fragments ont été obtenus par réaction d'amplification par la polymérase sur différentes matrices (p53 pour le domaine homologue et matrices d'origine différentes
20 pour les domaines d'oligomérisation hétérologues, notamment artificiels) au moyen de différents oligonucléotides. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions décrites en A4.1 ci-dessus.

A5.1 - Construction d'un ADNc comprenant un domaine d'oligomérisation artificiel.

25 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc comprenant un domaine d'oligomérisation artificiel, constitué d'un leucine zipper artificiel. Cet ADNc est ensuite utilisé pour la construction de variants à partir des fragments

75-325 (exemple A3.1) et 75-336 (exemple A3.2.) de la protéine p53 humaine et de leurs dérivés modifiés au niveau de la cystéine 182.

Cet ADNc a été construit à partir des 6 oligonucléotides suivants.

lz1-5' (SEQ ID n° 19) :

5 GATCTGAAGGCCCTCAAGGAGAAGCTGAAGGCC

lz2-5' (SEQ ID n° 20) :

CTGGAGGAGAAGCTGAAGGCCCTGGAGGAGAAGCTG

lz3-5' (SEQ ID n° 21) :

AAGGCACTAGTGGGGGAGCGATGATGAATCGATATCGC

10 lz1-3' (SEQ ID n° 22) :

CTCCTCCAGGGCCTTCAGCTTCTCCTTGAGGGCCTTCA

lz2-3' (SEQ ID n° 23) :

TAGTGCCTTCAGCTTCTCCTCCAGGGCCTTCAGCTT

lz3-3' (SEQ ID n° 24) :

15 GGCCGCGATATCGATTCATCATCGCTCCCCAC

20 Ces oligonucléotides ont été synthétisés au moyen d'un synthétiseur automatique d'ADN, en utilisant la chimie des phosphoramidites. Ces six oligonucléotides présentent des complémentarités deux à deux (lz1-5'/lz1-3', lz2-5'/lz2-3', lz3-5'/lz3-3') et des complémentarités chevauchantes (lz1-3'/lz2-5', lz2-3'/lz3-5') permettant l'obtention du domaine d'oligomérisation par simple hybridation et ligation. La séquence LZ résultante est donnée SEQ ID n° 1.

A5.2 - Construction d'un ADNc comprenant le domaine d'oligomérisation naturel de la p53 humaine.

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc comprenant le domaine d'oligomérisation naturel de la p53 humaine. Cet ADNc est représenté par le fragment codant pour les acides aminés 325 à 356 de p53 contenu dans les constructions 75-367 (exemple A3.4), 75-AS (exemple A3.5), 75-393 (exemple A3.6) et de leurs dérivés modifiés au niveau de la cystéine 182.

Exemple B - Construction des genes codant pour différents variants de la protéine p53

B1 - Clonage des différents fragments de p53

Chacun des différents fragments obtenus par PCR décrit dans l'exemple A a été cloné après PCR dans le vecteur pBC SK+ (Stratagène) en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Hind III et Not I (Figure 3).

Les produits de ces constructions portent les numéros suivants:

	75-325	--> pEC 104
15	75-336	--> pEC 106
	75-343	--> pEC 171
	75-367	--> pEC 131
	75-AS	--> pEC 132
	75-393	--> pEC 133

A partir de ces produits et par mutagénèse dirigée en utilisant l'oligonucléotide-directed in vitro mutagenesis system (Amersham) et l'oligonucléotide H182, ont été obtenues les constructions correspondantes portant une histidine en position 182. Ces constructions portent les numéros suivants:

25	75-325(H182)	--> pEC 134
	75-336(H182)	--> pEC 135

75-367(H182)	--> pEC 136
75-AS(H182)	--> pEC 137
75-393(H182)	--> pEC 138

5 B2 - Fusion du leucine-zipper aux fragment 75-325, 75-336 et 75-343
et à leur variant H182

Les oligonucléotides constituant le leucine-zipper (lz1-5', lz1-3', lz2-5', lz2-3', lz3-5' et lz3-3') ont été phosphorylés à l'aide de la T4 kinase, puis hybridés tous ensemble et insérés dans les vecteurs pEC 104, 106, 134 et 135 et 171 préalablement digérés par les enzymes de restriction BamHI et
10 NotI (Figure 4).

Les produits de ces constructions portent les numéros suivants:

75-325-lz	--> pEC 107
75-336-lz	--> pEC 110
75-343-lz	---> pEC 174
15 75-325(H182)-lz	--> pEC 139
75-336(H182)-lz	--> pEC 140

B3 - Fusion du domaine activateur de la transcription à l'ensemble des fragments p53

Les produits finaux ont été obtenus par une ligation à trois partenaires
20 effectuée de la façon suivante (Figure 5):

Le domaine activateur de la transcription dérivé de VP16 décrit dans l'exemple A3 a été préparé par digestion enzymatique des produits de PCR par les enzymes de restriction Hind III et Sal I.

Les différents fragments p53 précédemment obtenus (75-325-lz,
25 75-336-lz, 75-343-lz, 75-AS, 75-367, 75-393 et leurs variants H182) ont été

isolés après digestion enzymatique des plasmides les contenant par les enzymes de restriction Sall et NotI.

Les combinaisons possibles (domaine activateur/p53) ont été constituées et insérées simultanément dans le vecteur pBC SK+ (Stratagène)
 5 préalablement digéré par les enzymes de restriction Hind III et Not I.

Les produits de ces constructions portent les numéros suivants:

	VP16-75-325-lz	V-325	--> pEC 114 (SEQ ID n° 25)
	VP16-75-336-lz	V-336	--> pEC 116 (SEQ ID n° 26)
	VP16-75-367	V-367	--> pEC 141 (SEQ ID n° 27)
10	VP16-75-AS	V-AS	--> pEC 143 (SEQ ID n° 28)
	VP16-75-393	V-393	--> pEC 145 (SEQ ID n° 29)
	VP16-75-343-lz	V-343	--> pEC 175 (SEQ ID n° 30)
	VP16-75-325(H182)-lz	V-325H	--> pEC 147
	VP16-75-336(H182)-lz	V-336H	--> pEC 149
15	VP16-75-367(H182)	V-367H	--> pEC 151
	VP16-75-AS(H182)	V-ASH	--> pEC 153
	VP16-75-393(H182)	V-393H	--> pEC 155

Les produits correspondants portant un domaine liant spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur à la place du domaine
 20 VP16 sont construits de la même façon. Ces constructions sont désignées ci-dessous :

	ScFv-75-325-lz	S-325	--> pEC 176 (SEQ ID n° 31)
	ScFv-75-336-lz	S-336	
	ScFv-75-367	S-367	
25	ScFv-75-AS	S-AS	
	ScFv-75-393	S-393	
	ScFv-75-325(H182)-lz	S-325H	
	ScFv-75-336(H182)-lz	S-336H	

	ScFv-75-367(H182)	S-367H	
	ScFv-75-AS(H182)	S-ASH	
	ScFv-75-393(H182)	S-393H	
	(325-393)-75-325-lz	393-325	--> pEC 177 (SEQ ID n° 32)
5	(325-393)-75-336-lz	393-336	
	(325-393)-75-367	393-367	
	(325-393)-75-AS	393-AS	
	(325-393)-75-393	393-393	
	(325-393)-75-325(H182)-lz	393-325H	
10	(325-393)-75-336(H182)-lz	393-336H	
	(325-393)-75-367(H182)	393-367H	
	(325-393)-75-AS(H182)	393-ASH	
	(325-393)-75-393(H182)	393-393H	
	(325-360)-75-325-lz	360-325	--> pEC 178 (SEQ ID n° 33)
15	(325-360)-75-336-lz	360-336	
	(325-360)-75-367	360-367	
	(325-360)-75-AS	360-AS	
	(325-360)-75-393	360-393	
	(325-360)-75-325(H182)-lz	360-325H	
20	(325-360)-75-336(H182)-lz	360-336H	
	(325-360)-75-367(H182)	360-367H	
	(325-360)-75-AS(H182)	360-ASH	
	(325-360)-75-393(H182)	360-393H	

Les produits contenant le domaine 325-360 de la p53 en
 25 remplacement du domaine transactivateur (1-74) peuvent se voir additionner
 un séparateur synthétique (Hinge) obtenu par insertion au site Sal I d'un
 fragment d'ADN obtenu par hybridation de la paire d'oligonucléotides
 synthétiques complémentaires Hinge-up et Hinge-down suivants:

Hinge-up (SEQ ID n° 42) :

TCGAGGAGGTGGTGGCTCTGGAGGCGGAGGATCCGGCGGTGGA
GGTTC

Hinge-down (SEQ ID n° 43) :

TCGAGAACCCCTACCGCCGGATCCTCCGCCTCCAGAGCCACCAC

5 CTCC

La séquence d'ADN double brin Hinge résultante est la suivante

TCGAGGAGGTGGTGGCTCTGGAGGCGGAGGATCCGGCGGTGGAGGTTC
CCTCCACCACCGAGACCTCCGCCTCCTAGGCCGCCATCCCCAAGAGCT

et la séquence protéique correspondante est (SEQ ID n° 44):

10 Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser

Les produits correspondants sont désignées ci-dessous :

	(325-360)-Hinge-75-325-lz	360h-325--> pEC 179 (SEQ ID n° 34)
	(325-360)-Hinge-75-336-lz	360h-336
	(325-360)-Hinge-75-367	360h-367
15	(325-360)-Hinge-75-AS	360h-AS
	(325-360)-Hinge-75-393	360h-393
	(325-360)-Hinge-75-325(H182)-lz	360h-325H
	(325-360)-Hinge-75-336(H182)-lz	360h-336H
	(325-360)-Hinge-75-367(H182)	360h-367H
20	(325-360)-Hinge-75-AS(H182)	360h-ASH
	(325-360)-Hinge-75-393(H182)	360h-393H

Exemple C - Construction de vecteurs d'expression des variants de p53

Cet exemple décrit la construction de vecteurs utilisable pour le
25 transfert des acides nucléiques de l'invention in vitro ou in vivo.

C1 - Construction de vecteurs plasmidiques

Pour la construction de vecteurs plasmidiques, 2 types de vecteurs ont été utilisés.

- 5 - Le vecteur pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Ce vecteur est un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les variants ont été insérés dans ce vecteur sous forme de fragments HpaI-EcoRV. Ils sont ainsi placés sous le contrôle du promoteur de l'enhancer du virus SV40.
- 10 - Le vecteur pCDNA3 (Invitrogen). Il s'agit également d'un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les variants de l'invention sont ainsi placés, dans ce vecteur, sous le contrôle du promoteur précoce du CMV. Toutes les constructions décrites dans l'exemple B3 ont été introduites dans ce vecteur sous forme d'un fragment Hind III / Not I pour
15 être testées dans les différents systèmes d'évaluation *in vivo*.

C2 - Construction de vecteurs viraux

Selon un mode particulier, l'invention réside dans la construction et l'utilisation de vecteurs viraux permettant le transfert et l'expression *in vivo* des acides nucléiques tels que définis ci-avant.

- 20 S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi
25 les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus

d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

5 Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et un acide nucléique selon l'invention. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique
10 connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents
15 mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation
20 préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et l'acide nucléique de l'invention (Cf FR94 13355). Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

25 Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la
30 séquence d'ADN d'intérêt. La recombinaison homologue se produit après

co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans
5 lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire
10 humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant une séquence nucléique de l'invention d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Une lignée cellulaire utilisable est par exemple la lignée 293. Les AAV recombinants produits sont
15 ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick,
20 BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env).
25 Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné
30 MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey

sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants selon l'invention comportant un acide nucléique selon l'invention, un plasmide comportant
5 notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ledit acide nucléique est construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées
10 d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences
15 d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus
20 recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes dans les cellules tumorales.

C3 - Vecteurs chimiques

Parmi les vecteurs synthétiques développés, on préfère utiliser
25 dans le cadre de l'invention les polymères cationiques de type polylysine, (LKLK)_n, (LKKL)_n, polyéthylène imine et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines

(lipofectamine, transfectam, etc) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire. En outre, le concept de la transfection ciblée a été développé, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit. La préparation d'une composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement par simple mise en contact des différents composants.

Exemple D - Evaluation fonctionnelle des variants de p53

Les variants de p53 selon l'invention ont été évalués en test cellulaire pour les critères suivants:

- liaison à une séquence d'ADN double brin spécifique
- fonction transactivatrice
- activité antiproliférative
- activité apoptotique
- potentiel oncogénique associé à certaines mutations de p53

Les constructions utilisées plus particulièrement pour cette évaluation sont les constructions V-325, V-336, V-343 et AS décrites dans l'exemple B.

D1 Reconnaissance de séquences d'ADN double brin spécifiques par les molécules hybrides de l'invention

D1.1 Production des molécules hybrides

Le cDNA de la p53 sauvage a été cloné dans le vecteur pBlueBacIII (Invitrogen) au site BamHI. Par insertion dans le plasmide pAcHLT-A (Pharmingen) du fragment contenant le cDNA de V325 obtenu par digestion du plasmide pEC114 par les enzymes EcoR I et Not I a été généré un
5 vecteur permettant l'obtention d'un baculovirus recombinant ayant pour but l'expression d'une protéine V325 étiquetée en N-terminale par une séquence peptidique contenant entre autres un enchainement de 6 résidus histidine. A partir de ces vecteurs, des baculovirus recombinants ont été produits et purifiés suivant les instructions des fabricants (Invitrogen, Pharmingen). Les
10 deux protéines ont été purifiées à homogénéité à partir d'extraits nucléaires de cellules d'insectes SF9 infectées par leur baculovirus respectif, les extraits nucléaires étant obtenus en suivant la procédure décrite par Delphin et al. (C. Delphin, Eur. J. Biochem., 223, 683-692, 1994).

La p53 sauvage est purifiée par immuno-affinité sur l'anticorps
15 monoclonal pAb421 (Oncogene Sciences, Ab-1) suivant le protocole suivant: l'extrait nucléaire des cellules infectées est incubé 3 h à 4 °C avec un gel de protéine A-agarose sur lequel a été couplé covalamment l'anticorps pAb421. Après lavage extensif du gel par un tampon 50 mM TrisHCl pH 7,8 contenant 1 M KCl et des inhibiteurs de protéases, la protéine p53 est éluée par le
20 peptide correspondant à l'épitope reconnu par cet anticorps sur p53 (KKGQSTSRHK), ce peptide étant utilisé à une concentration de 5 mg/ml dans la solution utilisée pour le lavage. Après concentration sur Centricon-30 (Amicon Grace), la p53 éluée est séparée du peptide et purifiée à homogénéité par perméation sur gel sur une colonne de Superose 6
25 HR10/30 équilibrée par 50 mM TrisHCl pH 7.5, 0,2 M NaCl, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM ZnCl₂, 10 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 0,1 % NP-40, 5 % Glycérol. Les fractions contenant p53 sont aliquotées et immédiatement congelées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

La protéine V325 étiquetée en N-terminale par une séquence
30 peptidique contenant entre autres un enchainement de 6 résidus histidine

appelée désormais HisV325 a été purifiée par une procédure adaptée de Hochuli et al. (Bio/Technology Vol 6 (1988) 1321). Avant d'être appliquée sur le gel de Nickel-NTA agarose, l'extrait nucléaire des cellules infectées est dessalé sur une colonne PD10 (Pharmacia) équilibrée en tampon 50 mM phosphate de sodium pH 8 contenant 5 mM β -mercaptoéthanol, 0,1 % NP-40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. L'incubation de l'extrait nucléaire avec le gel de Nickel-NTA agarose a été réalisée dans ce tampon pendant 1 h à 4 °C sous agitation. Le gel est ensuite lavé extensivement par le même tampon à pH 6. La protéine HisV325 est éluée par 0,3 M imidazole dans ce dernier tampon après lavage du gel en 0,1 M imidazole. Les fractions contenant HisV325 sont aliquotées et immédiatement congelées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

D1.2 Construction de la séquence d'ADN double brin spécifique

La séquence d'ADN double brin spécifique utilisée dans cette expérience est constituée de deux oligonucléotides de synthèse dont la séquence est la suivante:

Oligo 5568 (SEQ ID n°45):

GATCCGAACATGTCCCAACATGTTGA

Oligo 5569 (SEQ ID n°46):

AGCTTCAACATGTTGGGACATGGTTCG

Ces deux oligonucléotides de synthèse ont été marqués au phosphore 33 par incubation de 30min à 37°C de 5 pmoles de chaque oligonucléotide dans 20 μ l du milieu réactionnel suivant:

Tris-HCl pH7,6	50 mM
MgCl ₂	10 mM
dithiothréitol	5 mM
Spermidine	100 μ M

EDTA	100 μ M
ATP- γ - ³² P (Amersham)	50 μ Ci (1000-3000 Ci/mmol)
T4 kinase (Boehringer)	10 U

Puis les deux oligonucléotides ainsi marqués ont été hybridés en présence de 100 mM NaCl pour reconstituer la séquence double brin WAF-RE suivante contenant la séquence spécifique reconnue par p53 dans la région promotrice du gène WAF-1 (W.S. El-Deiry, Cell Vol75 (1993) 817):

GATCCGAACATGTCCCAACATGTTGA

GCTTGTACAGGGTTGTACAACTTCGA

10 D1.3 Reconnaissance de la séquence double brin WAF-RE par les molécules hybrides de l'invention.

Pour mettre en évidence une reconnaissance spécifique de la séquence double brin WAF-RE par les molécules hybrides de l'invention, des expériences de retard sur gel ont été réalisées sur le principe décrit ci-après.

15 La réaction de liaison à l'ADN est effectuée dans 25 μ l de milieu réactionnel (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,05 mM ZnCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mg/ml BSA, 10 % glycérol, 1% Nonidet P-40, 0,1M NaCl, 2 μ g/ml aprotinine, 2 μ g/ml E-64, 2 μ g/ml leupeptine, 2 μ g/ml pepstatine) par addition de la séquence WAF-RE (2,4 10^{-8} M) préparé selon l'exemple précédent, de 1,2 10^{-6} M de l'oligonucléotide compétiteur froid AP2 (Promega) utilisé pour éliminer la fixation non spécifique et de 30 ng de molécules hybrides à tester en présence ou non de p53 sauvage (entre 3 et 30 ng), la p53 sauvage pouvant être activée pour son activité de fixation spécifique à l'ADN par 300 ng d'anticorps pAb421 (T. R. Hupp, Cell Vol 71 (1992) 875). Les mélanges réactionnels sont incubés 30 minutes sur glace et les mélanges finaux sont soumis à une électrophorèse native sur gel de polyacrylamide à 4 % avec migration à 200V et 16°C. Le gel est ensuite séché et autoradiographié.

Le résultat d'une expérience représentative de compétition entre p53 sauvage et HisV325 en retard sur gel est présenté sur la Figure 6. Ce résultat montre que His-V325 reconnaît la séquence double brin WAF-RE avec une affinité comparable à celle de la p53 sauvage. On notera que
5 HisV325 donne une bande majoritaire en gel retard qui migre plus vite que celle obtenue avec la p53 sauvage. Ceci pourrait indiquer que HisV325 se fixe sous forme de dimère. De plus, comme attendu, cette bande n'est ni déplacée, ni amplifiée par la présence de pAb421. Enfin, en l'absence de pAb421, la p53 sauvage fixe beaucoup moins de RE-WAF que ne le fait
10 V325.

D2 - Evaluation de la fonction transactivatrice

La fonction transactivatrice des constructions a été évaluée dans un système de transactivation in vivo dans les cellules SAOS-2 (ostéosarcome humain) déficientes pour les deux allèles de la protéine p53 (cellules
15 accessibles à l'ATCC sous le numéro HTB85) et dans des lignées tumorales H358 (Maxwell & Roth, Oncogene 8 (1993), 3421) et HeLa (ATCC CCL 2). Ce système repose sur l'utilisation d'un gène rapporteur dosable enzymatiquement et placé sous la dépendance d'un promoteur contenant les motifs nucléotidiques de reconnaissance spécifique par la forme sauvage de
20 la p53 (cf protocoles expérimentaux).

Dans ce test, le gène rapporteur est le gène CAT (chloramphénicol-acétyl transférase) et la séquence de reconnaissance par la p53 est la séquence consensus (p53RE) définie par Funk et collaborateurs (Mol. Cell. Biol. 12 (1992) 2866).

25 L'évaluation de cette fonction a été effectuée en comparaison avec celle de la protéine sauvage pour trois types de critères différents.

D2.1 - Activité transactivatrice en dose réponse

Les cellules ($3,5 \times 10^5$) sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre contenant 3 ml de milieu DMEM (Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur, et cultivées sur la nuit dans un incubateur à CO₂ (5%) à 37°C. Les différentes constructions sont alors transfectées en utilisant la lipofectAMINE (Gibco BRL) comme agent de transfection de la façon suivante: 3 µg de plasmide total sont incubés (dont 0,5 µg du plasmide reporter) avec 10 µl de lipofectAMINE pendant 30 min avec 3 ml de milieu Opti-MEM (Gibco BRL) sans sérum (mélange de transfection). Pendant ce temps, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis incubées 4 h à 37°C avec le mélange de transfection, après quoi celui-ci est aspiré et remplacé par 3 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et les cellules remises à pousser pendant 48 h à 37°C.

15 Protocole de dosage de l'activité CAT

48h après la transfection, les cellules sont lavées une fois en PBS puis gratées et récupérées dans 100 µl de tampon Tris 0,25 M pH 8 et à lysées par trois cycles de congélation - décongélation dans un bain éthanol/carboglace. L'extrait cellulaire total ainsi obtenu est mis à centrifuger 15 min à 10000 rpm et le surnageant récupéré pour le dosage de l'activité. Celui-ci est effectué en additionnant 20 µl d'extrait cellulaire à 130 µl d'un mélange réactionnel dont la composition finale est la suivante:

	- Acétyl-Coenzyme A	0,4 mM
	- Chloramphénicol, D-thréo-(dichloroacétyl-1,2- ¹⁴ C)	23 µM (200 nCi)
25	- Tris	0,18 M pH 8

Après 1 heure d'incubation à 37°C, les produits de la réaction sont extraits par 250 µl d'acétate d'éthyle dont 20 µl sont déposés sur une plaque de silice (chromatographie en couche mince) mise à migrer dans un mélange

contenant 95% de chloroforme et 5% de méthanol. La plaque de chromatographie ainsi obtenue est enfin révélée à l'aide d'un instantimager (Packard instruments) qui permet de calculer le rapport des différents produits d'acétylation, rapport qui reflète l'activité de l'enzyme

5 Chloramphénicol-Acétyl-Transférase et donc l'activité transactivatrice des différentes constructions.

Les résultats obtenus dans la lignée SAOS-2 avec les constructions placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3) et présentés dans les Figures 7 et 8 montrent les propriétés suivantes pour chacune des

10 constructions:

- la protéine p53 présente une activité dose-dépendante qui tend vers la saturation pour des doses élevées (à partir de 100ng de plasmide). Cette saturation peut traduire la nécessité de cofacteurs qui seraient limitants dans ces conditions.
- 15 - la protéine AS conserve la capacité d'activer la transcription de la protéine sauvage
- les protéines V-325, V-336 et V-343 présentent, tout comme la protéine p53, une activité transactivatrice qui ne semble pas quant à elle saturable aux fortes doses. Il est donc possible que cette absence apparente
- 20 de saturation puisse conduire à une augmentation globale de l'activité. Il apparait en outre que la construction V-325 est plus active que ses homologues V-336 et V-343, ce qui suggère que les protéines chimères portant la région 75-325 sont particulièrement avantageuses.

Dans le but de confirmer ces propriétés une expérience similaire a été

25 effectuée dans la lignée tumorale H 358 qui est tout comme la lignée SAOS-2, déficiente pour les deux allèles du gène p53. Dans cette expérience, chaque transfection a été effectuée avec 50 ng de chacune des construction placée sous dépendance du promoteur CMV. Les résultats présentés sur le

Tableau 1 montrent clairement que les deux variants V-325 et V-336 présentent une activité transactivatrice améliorée par rapport à celle de la protéine p53 sauvage, avec de nouveau une meilleure activité du variant V-325.

5 Tableau 1: Activité transactivatrice dans les cellules de la lignée tumorale H 358.

	pCDNA 3	p53 sauvage	V-325	V-336
Activité CAT Relative	1	6	25	16

Ces deux essais confirment que les variants de l'invention possèdent au moins une des propriétés de la p53 améliorée.

Afin de vérifier que cette différence d'activité n'est pas due à une
 10 différence d'expression mais bien à une activité accrue des variants de l'invention, le niveau d'expression de la protéine p53 sauvage et des variants V-325, V-336 et V-343 a été analysé dans les cellules SAOS-2. Pour ce faire les cellules sont transfectées par 3µg de chacun des plasmides utilisés dans l'expérience précédente, et récupérées 24 heures et 48 heures après la
 15 transfection. Après deux lavages en tampon PBS (Gibco BRL), les cellules sont lysées 15 minutes à 4°C dans 50µl de tampon RIPA (Tris-Hcl 10 mM pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%, Nonidet-P40, 1% déoxycholate de sodium, 0,1% dodécyl sulfate de sodium) additionné de 2 mM PMSF, 20 µg/ml aprotinine, 2 µg/ml E64, 2 µg/ml leupeptine et 2 µg/ml pepstatine.
 20 Après 15 min de centrifugation à 15000 rpm, les surnageants sont prélevés, additionnés de tampon de migration (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970) et soumis à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant à 200V suivant le protocole précédemment décrit (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Puis les protéines sont transférées sur
 25 membrane de PVDF (NEN Research Products) en utilisant le système de transfert semi-sec NOVEX suivant les recommandations du fabricant, et révélées à l'aide de l'anticorps monoclonal pAb 240 (Oncogene Sciences,

Ab-3) et d'un anticorps secondaire (lapin anti-souris) couplé à la peroxydase (Nordic Immunology) en utilisant le kit ECL (Amersham).

Le résultat de cette expérience présenté dans la Figure 9 montre que les variants V-325 et V-336 sont exprimés à un niveau comparable à celui de la protéine p53 sauvage et que le variant V-343 semble légèrement mieux exprimé que les précédents. De plus la comparaison des niveaux d'expression à 24 et 48 heures semble indiquer que la stabilité relative de chacune des constructions est similaire. Ce résultat montre donc que l'activité accrue des variants de l'invention V-325 et V-336 n'est pas due à une meilleure expression mais probablement à un potentiel d'activateur transcriptionnel accru, contrairement au variant V-343.

Par la suite, et dans le but de confirmer cette capacité des variants de l'invention d'activer un gène placé sous la dépendance d'un élément de reconnaissance de la p53 sauvage, l'étude de l'activation de gènes endogènes a été effectuée en regardant l'expression des gènes hdm2 et WAF1, normalement induits par la protéine p53.

Cette expérience a été effectuée dans la lignée cellulaire EB (cancer du colon) déficiente pour les deux allèles codant pour la protéine p53 (Shaw et al., PNAS 89 (1992) 4495). Un clone stable exprimant la protéine p53 sous contrôle du promoteur inductible de la métallothionéine a été construit à partir de cette lignée (clone EB-1 (Shaw et al., PNAS 89 (1992) 4495)). De la même façon un autre clone stable exprimant la protéine V-325 sous contrôle du promoteur inductible de la métallothionéine a été construit en utilisant un plasmide dérivé du vecteur pmlMT1i (obtenu de P. Shaw) par insertion du cDNA codant pour la protéine V-325 aux sites EcoR I - Not I (pmlMT1i-V325). Pour ce faire, les cellules EB ($3.5 \cdot 10^5$ cellules) ont été transfectées par 1,3 µg du plasmide pmlMT1i-V325 et 200 ng de plasmide pcDNA3 suivant le protocole précédemment décrit et les clones stables ont été sélectionnés après transfection par croissance dans un milieu contenant

800µg/ml de généticine. Un clone exprimant V-325 de façon inductible à un niveau comparable à l'expression de la protéine p53 dans le clone EB-1 a été sélectionné (clone EB-V325).

Les clones EB-1 et EB-V325 ainsi que les cellules parentales EB (⁶ 5 cellules) ont été soumis à un traitement au ZnCl₂ (200 µM) et des extraits cellulaires ont été effectués à différents temps et soumis à électrophorèse et transfert sur membrane comme décrit précédemment. Les protéines transférées ont été révélées par trois anticorps différents; l'anticorps monoclonal pAb240 dirigé contre la protéine p53, et deux anticorps 10 polyclonaux dirigés l'un contre la protéine hdm2 et l'autre contre la protéine WAF1. Les résultats de cette expérience présentés dans la Figure 10, montrent que: 1) la protéine p53, absente dans les cellules EB, EB-V325 et EB-1 en l'absence d'induction, est exprimée dans le clone EB-1 dès 4 heures après le début du traitement au zinc, et le variant V-325 est exprimé de la 15 même façon dans le clone EB-V325, 2) la protéine WAF1 dont l'expression semble être induite dans les cellules EB par le traitement au zinc 4 heures après le début de celui-ci, voit son expression prolongée jusqu'à 16 heures dans les clones EB-1 et EB-V325, et 3) l'induction de la protéine hdm2 n'est observable que dans les clones EB-1 et EB-V325, avec une expression 20 accrue dans le clone EB-V325.

Ces résultats montrent que l'activation de la transcription par le variant V-325 se traduit par l'induction de l'expression de gènes normalement induits par la protéine p53 sauvage, et que ce variant présente bien une activité accrue dans un contexte physiologique par rapport à la protéine p53 25 sauvage.

D2.2 - Effet de la protéine E6 (HPV18) sur la fonction transactivatrice

Les protocoles utilisés sont identiques à ceux décrits dans l'exemple D1.1. Dans cette expérience de transfection, les constructions placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3) ont été co-transfectées avec des

concentrations croissantes d'un plasmide exprimant E6 sous contrôle du promoteur SV40 (pSV2). Les résultats obtenus dans la lignée SAOS-2 et présentés dans la Figure 11 montrent les propriétés suivantes pour chacune des constructions:

5 - l'activité de la p53 décroît au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de E6, cette décroissance étant très probablement le reflet de la dégradation de la p53 induite par E6.

 - la protéine V-336 présente une absence de sensibilité à E6.

 - la protéine V-325 semble pouvoir être légèrement activée par E6. La
10 protéine V-325 est toujours, et dans toutes les situations observées, plus active que la p53. Pour confirmer cette différence de comportement vis-à-vis de la protéine E6, l'activité transactivatrice des constructions V-325 et V-336 dans des cellules HPV18 positives (HeLa) et donc exprimant la protéine E6, a été testée et comparée à celle de la p53 sauvage.

15 Dans cette expérience de transfection effectuée selon le protocole décrit précédemment, les différentes constructions ont été placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3).

 Les résultats présentés dans la Figure 12 montrent une très nette activité transcriptionnelle des deux constructions V-325 et V-336, dans un
20 contexte où la protéine p53 sauvage est très peu active, laissant supposer à nouveau que ces deux constructions sont insensibles à E6 contrairement à la protéine sauvage.

 Pour tester si cette absence de sensibilité à la protéine E6 est le reflet d'une meilleure stabilité en réponse à la dégradation induite par cette
25 protéine, une expérience de dégradation *in vitro* a été effectuée.

 Les différentes molécules utilisées dans cette expérience ont été obtenues par traduction *in vitro* en lysat de réticulocytes des molécules

décrites dans l'exemple C1 (vecteur pcDNA3) en utilisant le kit TNT Coupled Reticulocyte lysate Systems (Promega) suivant le protocole expérimental décrit par le fournisseur pour un volume réactionnel total de 50 µl.

Pour cette expérience, les molécules hybrides de l'invention V-325 et V-336 ainsi que la protéine p53 sauvage sont produites par traduction *in vitro* en présence de 44 µCi de ³⁵S-méthionine (Amersham) (1175 Ci/mmele) pour générer ces molécules hybrides radioactivement marquées. La protéine E6 (HPV18), quand à elle est produite dans les mêmes conditions mais en absence de ³⁵S-méthionine.

Puis 2 µl de chacun des produits radiomarqués (p53, V-325 et V-336) sont mis à incuber à 30°C avec 2 µl de protéine E6 non radiomarquée et 10 µl de lysat de réticulocyte dans un volume final de 40 µl de tampon Tris-HCl 25mM, pH 7,5, 100 mM NaCl, 3 mM DTT. La réaction est ensuite arrêtée à différents temps par prélèvement de 7,5 µl du milieu réactionnel et addition de 7,5 µl de tampon de migration (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970) et les échantillons ainsi préparés sont soumis à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant à 200 V suivant le protocole précédemment décrit (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Le gel est ensuite séché et révélé à l'aide d'un instantimager (Packard instruments) qui permet d'estimer les quantités de variants de l'invention n'ayant pas été dégradés au cours de la réaction.

Le résultat de cette expérience présenté sur la figure 13 montre clairement que les variants V-325 et V-336 sont beaucoup plus résistants que la protéine p53 sauvage à la dégradation induite par E6, avec de nouveau de meilleures propriétés pour le variant V-325 en terme de résistance à la dégradation. Ces résultats reflètent bien les différences de sensibilité de la protéine p53 sauvage et des variants V-325 et V-336 à la protéine E6 observés au niveau de l'activité transcriptionnelle dans les expériences précédentes (Figures 11 et 12).

Ce comportement fait de ces deux constructions des candidats super-sauvage particulièrement avantageux pour le traitement de pathologies liées à l'infection par HPV16 ou HPV18.

5 D2.3 - Effet d'un mutant p53 dominant-négatif sur la fonction transactivatrice

Dans cette expérience, le mutant H175, décrit comme dominant oncogénique et dominant négatif vis à vis de la protéine p53 sauvage, a été utilisé. Dans cette expérience de transfection effectuée selon le protocole décrit précédemment, les différentes constructions ainsi que le mutant H175
10 ont été placés sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3). Chacune des constructions a été co-transfectée avec des concentrations croissantes du plasmide exprimant le mutant H175.

Les résultats présentés dans la Figure 14 montrent les propriétés suivantes pour chacune des constructions:

15 - la protéine p53 voit son activité transactivatrice diminuer lorsqu'elle est en présence d'un excès de forme mutée H175, ce qui correspond bien à une situation physiologique puisque l'on sait que ce type de forme mutante est beaucoup plus stable que la p53 sauvage et donc toujours en excès. On mesure donc bien là l'effet dominant-négatif de ce mutant.

20 - la protéine AS présente une sensibilité accrue à l'effet dominant négatif du mutant H175, puisque sensible à des concentrations plus faibles de celui-ci.

- au contraire, les protéines V-325 et V-336 ne sont non seulement plus sensibles à l'effet dominant-négatif mais voient même leur activité
25 augmentée de façon dose-dépendante en présence de la forme mutante H175. De nouveau, dans cet essai la protéine V 325 présente un effet accru par rapport à la protéine V-336 la confirmant un peu plus dans son possible statut de super-sauvage.

D2.4 - Effet de la protéine hdm2 sur la fonction transactivatrice

Les protocoles utilisés sont identiques à ceux décrits dans l'exemple D1.1. Dans cette expérience de transfection, les constructions placées sous contrôle du promoteur CMV (pcDNA3) sont co-transfectées avec des concentrations croissantes d'un plasmide exprimant hdm2 (fragment 1-134) sous contrôle du promoteur CMV (pcDNA3). Les résultats obtenus dans la lignée SAOS-2 et présentés dans la Figure 15 montrent les propriétés suivantes pour chacune des constructions:

- l'activité de la protéine p53 décroît au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de hdm2, ce qui correspond bien à une situation physiologique.

- la protéine V-325 semble être insensible à cette inhibition par hdm2.

Ce comportement fait de la protéine V-325 un candidat super-sauvage particulièrement avantageux pour le traitement de pathologies liées à a surexpression de hdm2, et plus particulièrement, au traitement des pathologies liées à la surexpression de protéines cellulaires interagissant avec le domaine N-terminal de la protéine p53.

Les résultats de ces quatre expériences montrent clairement que les variants selon l'invention, notamment les variants contenant la région 75-325-lz ou 75-336-lz, présentent 1) une activité transactivatrice accrue, 2) une sensibilité moindre à l'effet de la protéine E6 de HPV18, 3) l'absence de sensibilité à l'effet dominant-négatif de certains mutants de la p53 et même l'accroissement de son activité dans un tel contexte, et 4) une absence de sensibilité à la protéine hdm2. Ces différentes propriétés sont tout à fait remarquables et inattendues et confèrent aux variants de l'invention des avantages thérapeutiques considérables.

D3 - Effet sur la croissance cellulaire

L'effet des constructions V-325 et V-336 sur la croissance cellulaire a été testé en parallèle avec la p53 sur différents types de lignées cellulaires dans une expérience de formation de colonies résistantes à la néomycine suite à la transfection par des plasmides exprimant ces trois protéines.

- 5 Dans cette expérience de transfection effectuée selon le protocole décrit précédemment, les différentes constructions ont été placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3).

Protocole de formation de colonies résistantes à la néomycine

- 10 48h après transfection, les cellules sont gratées et transférées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre et remises à pousser avec 10 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et contenant 400 µg/ml de généticine (G418). Suite à une sélection de 15 jours en présence de G418, le nombre de colonies Neo^R est déterminé par comptage après coloration à la fuchsine.

- 15 Cette expérience a été effectuée sur différents types cellulaires dont le statut des protéines p53 et Ras est présenté dans le Tableau 2

Tableau 2: Statut des lignées cellulaires utilisées dans le test de formation de colonies Néo^R

lignée	p53	Ras	surexpression hdm2	n° ATCC
SAOS-2	- / -	?	-	HTB 85
HCT 116	?	Ki-Ras muté	-	CCL 247
H 322	L 248	?	-	(*)
H 460	sauvage	Ki-Ras muté	-	HTB 177
HeLa	sauvage	?	-	CCL 2
OsA-CL	?	?	+	(**)

(*) Putnam et al., Surg. Oncol., 1 (1993), 49

(**) Oliner et al., Nature, 358, (1992), 80

- 5 Les résultats de ces expériences sont présentés dans le Tableau 3 et sur la Figure 16.

Tableau 3: Formation de colonies Néo^R

lignée	vecteur	p53 sauvage	V-325	V-336
SAOS-2	253	17	12	13
HCT116	112	62	58	61
H 322	93	5	2	3
H 460	153	110	87	92
HeLa	172	151	31	47

Ces résultats montrent que les constructions V-325 et V-336 possèdent la capacité de bloquer la croissance cellulaire de façon au moins aussi efficace que la protéine p53 sauvage dans des contextes cellulaires où celle-ci peu fonctionner normalement (p53 sauvage ou double délétant), mais surtout qu'elles conservent cette activité même dans des contextes cellulaires où la protéine p53 sauvage est très peu active (cellules HeLa exprimant la protéine E6 de HPV18 et cellules OsA-CL présentant une surexpression de la protéine hdm2). Cette propriété confère aux variants de l'invention des avantages thérapeutiques considérables.

D4 - Activité apoptotique des variants de l'invention

L'activité apoptotique des variants de l'invention a été étudiée en utilisant les cellules EB, EB-1 et EB-V325 et les conditions d'induction précédemment décrites (exemple D1).

Les cellules ainsi induites (10^6 cellules) sont fixées et perméabilisées par une incubation de 40 minutes dans 1 ml de Permeafix (Ortho Diagnostic

Systems Inc.), puis lavées deux fois en tampon A (PBS (Gibco BRL) additionné de 0,5% de Tween 20), avant d'être resuspendues et incubées une heure à température ambiante dans 100 µl de tampon A additionné de 2% BSA (PBS-BSA) et 1 µg de l'anticorps monoclonal pAb240. Après deux
5 nouveaux lavages en tampon PBS-BSA, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante dans 100 µl du même tampon additionné de 1 µg d'un anticorps polyclonal secondaire couplé à la fluorescéine (GAM-FITC (Immunotech)). Puis, les cellules sont lavées deux fois dans le tampon A, resuspendues dans 1 ml du même tampon contenant 5 µg d'iodure de
10 propidium et 1 mg de RNase (DNase-free), et incubées 30 min à température ambiante avant d'être analysées par cytométrie de flux.

Les résultats d'une expérience d'induction de 24 et 48 heures effectuée sur les cellules EB-1 et EB-V325 sont présentés dans la Figure 17. Dans ces conditions les cellules exprimant la protéine p53 sauvage ou son
15 variant V-325 (détectés par l'anticorps pAb240) sont majoritairement réparties en phase G1 et sub-G1 (apoptose) après 24 heures d'induction, puis essentiellement en sub-G1 après 48 heures. Ce résultat indique clairement que la protéine V-325 est capable, tout comme la protéine p53 sauvage, d'induire l'apoptose.

20 Les résultats d'une expérience cinétique d'induction effectuée sur les cellules EB et les clones EB-1 et EB-V325 présentés dans la figure 18 montrent que le variant V-325 semble induire plus rapidement et plus massivement l'apoptose que la protéine p53 sauvage. En tenant compte du fait que les deux protéines semblent être exprimées à des niveaux
25 comparables dans ces clones (cf § D1), ce résultat conforte l'idée d'une activité améliorée du variant V-325 par rapport à celle de la protéine p53 sauvage.

LISTE DE SEQUENCES

- 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:
- (i) DEPOSANT:
- (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, AVENUE RAYMOND ARON
- 10 (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165
- (G) TELEPHONE: (1) 40.91.69.22
- 15 (H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.91
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: Variants de la protéine p53 et utilisations thérapeutiques
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 46
- 20 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- 25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:
- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 112 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 35 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN:
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 40 (iv) ANTI-SENS: NON
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- AGATCTGAAG GCCCTCAAGG AGAAGCTGAA GGCCCTGGAG GAGAAGCTGA AGGCCCTGGA 60
- GGAGAAGCTG AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGCGG CC 112
- 50
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:
- 55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 266 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

5 (iv) ANTI-SENS: NON

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AAGCTTGAAT TCGTTAACAT GTCCACGGCC CCCCCGACCG ATGTCAGCCT GGGGGACGAG	60
CTCCACTTAG ACGGCGAGGA CGTGGCGATG GCGCATGCCG ACGCGCTAGA CGATTTCGAT	120
15 CTGGACATGT TGGGGGACGG GGATTCCCCG GGGCCGGGAT TTACCCCCCA CGACTCCGCC	180
CCCTACGGCG CTCTGGATAT GGCCGACTTC GAGTTTGAGC AGATGTTTAC CGATGCCCTT	240
20 GGAATTGACG AGTACGGTGG TCGACC	266

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 76 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35 (iv) ANTI-SENS: NON

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCGAGCCTGC AGCCTAGAGC CTTCCAAGCC CTCATGAAGG AGGAAAGCCC AAAGTCTAG	60
45 TGAGGATCCG CGGCCG	76

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 788 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGGAAGCTTG GGCCGGGTCG ACCTGCACCA GCAGCTCCTA CACCGGCGGC CCCTGCACCA 60
 10 GCCCCCTCCT GGCCCTGTC ATCTTCTGTC CCTTCCCAGA AAACCTACCA GGGCAGCTAC 120
 GGTTCGTC TGGGCTTCTT GCATTCTGGG ACAGCCAAGT CTGTGACTTG CACGTACTCC 180
 CCTGCCCTCA ACAAGATGTT TTGCCAACTG GCCAAGACCT GCCCTGTGCA GCTGTGGGTT 240
 15 GATTCCACAC CCCCQCCCGG CACCCGCGTC CGCGCCATGG CCATCTACAA GCAGTCACAG 300
 CACATGACGG AGGTTGTGAG GCGCTGCCCC CACCATGAGC GCTGCTCAGA TAGCGATGGT 360
 20 CTGGCCCCCTC CTCAGEATCT TATCCGAGTG GAAGGAAATT TGCCTGTGGA GTATTTGGAT 420
 GACAGAAACA CTTTTCGACA TAGTGTGGTG GTGCCCTATG AGCCGCCTGA GGTGGCTCT 480
 GACTGTACCA CCATCCACTA CAACTACATG TGTAACAGTT CCTGCATGGG CGGCATGAAC 540
 25 CGGAGGCCCA TCCTCACCAT CATCACACTG GAAGACTCCA GTGGTAATCT ACTGGGACGG 600
 AACAGCTTTG AGGTGCGTGT TTGTGCCTGT CCTGGGAGAG ACCGGCGCAC AGAGGAAGAG 660
 30 AATCTCCGCA AGAAAGGGGA GCCTCACCAC GAGCTGCCCC CAGGGAGCAC TAAGCGAGCA 720
 CTGCCCAACA ACACCAGCTC CTCTCCCCAG CCAAAGAAGA AACCACTGGA TGGGGATCCG 780
 CGGCCGCC 788

35

(i) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 821 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

55 GGGAAGCTTG GGCCGGGTCG ACCTGCACCA GCAGCTCCTA CACCGGCGGC CCCTGCACCA 60
 GCCCCCTCCT GGCCCTGTC ATCTTCTGTC CCTTCCCAGA AAACCTACCA GGGCAGCTAC 120
 GGTTCGTC TGGGCTTCTT GCATTCTGGG ACAGCCAAGT CTGTGACTTG CACGTACTCC 180

5 CCTGCCCTCA ACAAGATGTT TTGCCAACTG GCCAAGACCT GCCCTGTGCA GCTGTGGGTT 240
 GATTCCACAC CCCC GCCCGG CACCCGCGTC CGCGCCATGG CCATCTACAA GCAGTCACAG 300
 CACATGACGG AGGTTGTGAG GCGCTGCCCC CACCATGAGC GCTGCTCAGA TAGCGATGGT 360
 CTGGCCCCCTC CTCAGCATCT TATCCGAGTG GAAGGAAATT TCGTGTGGA GTATTTGGAT 420
 10 GACAGAAACA CTTTTCGACA TAGTGTGGTG GTGCCCTATG AGCCGCCTGA GGTGGGCTCT 480
 GACTGTACCA CCATCCACTA CAACTACATG TGTAACAGTT CCTGCATGGG CGGCATGAAC 540
 CGGAGGCCCA TCCTCACCAT CATCACA CTG GAAGACTCCA GTGGTAATCT ACTGGGACGG 600
 15 AACAGCTTTG AGGTGCGTGT TTGTGCCTGT CCTGGGAGAG ACCGGCGCAC AGAGGAAGAG 660
 AATCTCCGCA AGAAAGGGGA GCCTCACCAC GAGCTGCCCC CAGGGAGCAC TAAGCGAGCA 720
 20 CTGCCCAACA ACACCAGCTC CTCTCCCCAG CCAAAGAAGA AACCCTGGA TGGAGAATAT 780
 TTCACCTTC AGATCCGTGG GCGTGAGGAT CCGCGGCCGC C 821

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 15 paires de bases
 30 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

45 ATGGAGGAGC CGCAG

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

- 5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:
GGCGGCCGCG ATATCGATTC ATCAGTCTGA GTCAGGCCCT TC 42
- 10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:
- 15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 36 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 20 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- 25
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:
GGCGGCCGCG ATATCGATTC ATCAGCTCGA GTGAGC 36
- 30
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:
- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 43 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 45 (iv) ANTI-SENS: NON
- 50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:
TCGAGCCTGC AGCCTAGAGC CTTCCAAGCC CTCATGAAGG AGG 43
- 55 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

5 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

15 AAAGCCCAAA CTGCTGATGA ATCGATATCG C

31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

30 (iv) ANTI-SENS: NON

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TGAGGGCTTG GAAGGCTCTA GGCTGCAGGC

30

40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 44 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
45 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

50 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GGCCGCGATA TCGATTCATC AGCAGTTTGG GCTTTCCTCC TTCA

44

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 39 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 15 (iv) ANTI-SENS: NON
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:
- 20 GGGAAGCTTG GGCCGGGTCG ACCTGCACCA GCAGCTCCT 39

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 32 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 35 (iv) ANTI-SENS: NON
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:
- 40 GGCGGCCGCG GATCCCCATC CAGTGGTTTC TT 32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- 50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 15 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 55 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

5 ATCTGAATGG CGCTC

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

20 (iv) ANTI-SENS: NON

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

GGCGGCCGCG GATCCTCACG CCCACGGATC TG

32

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

40 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

50 AAGCTTGAAT TCGTTAACAT GTCCACGGCC CCCCCGACC

39

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(iii) HYPOTHETIQUE: NON
5 (iv) ANTI-SENS: NON
- 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:
GGTCGACCAC CGTACTCGTC AAT 23
- 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:
(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 33 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
20 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
25 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
(iv) ANTI-SENS: NON
- 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:
35 GATCTGAAGG CCTCAAGGA GAAGCTGAAG GCC 33
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:
40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 36 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(iii) HYPOTHETIQUE: NON
50 (iv) ANTI-SENS: NON
- 55 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:
CTGGAGGAGA AGCTGAAGGC CCTGGAGGAG AAGCTG 36
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 38 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:
AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGC 38
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 42 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:
AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGC 38
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 42 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

5 TAGTGCCTTC AGCTTCTCCT CCAGGGCCTT CAGCTT 36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

20 (iv) ANTI-SENS: NON

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

GGCCGCGATA TCGATTCATC ATCGCTCCCC CAC 33

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1095 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

40 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

45 (ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..1095

50 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC 48
 Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His
 1 5 10 15

55 TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT 96
 Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp
 20 25 30

TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT 144

	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	
			35					40					45				
5	ACC	CCC	CAC	GAC	TCC	GCC	CCC	TAC	GGC	GCT	CTG	GAT	ATG	GCC	GAC	TTC	192
	Thr	Pro	His	Asp	Ser	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Asp	Phe	
		50					55					60					
10	GAG	TTT	GAG	CAG	ATG	TTT	ACC	GAT	GCC	CTT	GGA	ATT	GAC	GAG	TAC	GGT	240
	Glu	Phe	Glu	Gln	Met	Phe	Thr	Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Glu	Tyr	Gly	
	65					70					75				80		
15	GGT	CGA	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	CCT	GCA	CCA	GCC	288
	Gly	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	
					85					90					95		
	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	AAA	ACC	TAC	CAG	336
	Pro	Ser	Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Gln	Lys	Thr	Tyr	Gln	
				100					105					110			
20	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	GCC	AAG	384
	Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys	
			115					120					125				
25	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	432
	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Met	Phe	Cys	Gln	
		130					135					140					
30	CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	480
	Leu	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	
	145					150					155					160	
35	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	528
	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	
				165						170					175		
	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	576
	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	
				180					185				190				
40	AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	624
	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	
			195					200					205				
45	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	672
	Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	
		210					215					220					
50	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	720
	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Ile	
	225					230					235					240	
55	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	768
	His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	
					245					250				255			
	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC	AGT	GGT	AAT	CTA	816
	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	
				260					265					270			

	CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA	864
	Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg	
	275 280 285	
5	GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC	912
	Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His	
	290 295 300	
10	CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC	960
	His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr	
	305 310 315 320	
15	AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGG GAT CTG AAG	1008
	Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp Gly Asp Leu Lys	
	325 330 335	
20	GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG	1056
	Ala Leu Lys Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu	
	340 345 350	
25	GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA	1095
	Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Val Gly Glu Arg * *	
	355 360 365	
	(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:	
	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:	
30	(A) LONGUEUR: 1128 paires de bases	
	(B) TYPE: nucléotide	
	(C) NOMBRE DE BRINS: simple	
	(D) CONFIGURATION: linéaire	
35	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc	
	(iii) HYPOTHETIQUE: NON	
	(iv) ANTI-SENS: NON	
40	(ix) CARACTERISTIQUE:	
	(A) NOM/CLE: CDS	
	(B) EMBLACEMENT: 1..1128	
45	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:	
50	ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC	48
	Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
	370 375 380	
55	TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
	Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
	385 390 395	
	TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCC CCG GGA TTT	144
	Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
	400 405 410	

	ACC	CCC	CAC	GAC	TCC	GCC	CCC	TAC	GGC	GCT	CTG	GAT	ATG	GCC	GAC	TTC	192
	Thr	Pro	His	Asp	Ser	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Asp	Phe	
	415						420					425					
5	GAG	TTT	GAG	CAG	ATG	TTT	ACC	GAT	GCC	CTT	GGA	ATT	GAC	GAG	TAC	GGT	240
	Glu	Phe	Glu	Gln	Met	Phe	Thr	Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Glu	Tyr	Gly	
	430					435					440					445	
10	GGT	CGA	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	CCT	GCA	CCA	GCC	288
	Gly	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	
					450					455					460		
15	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	AAA	ACC	TAC	CAG	336
	Pro	Ser	Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Gln	Lys	Thr	Tyr	Gln	
				465					470					475			
20	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	GCC	AAG	384
	Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys	
			480					485					490				
	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	432
	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Met	Phe	Cys	Gln	
	495						500					505					
25	CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	480
	Leu	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	
	510					515				520						525	
30	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	528
	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	
					530					535					540		
35	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	576
	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	
				545				550					555				
40	AGC	GAT	GST	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	624
	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	
			560					565					570				
	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	672
	Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	
	575					580						585					
45	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	720
	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Ile	
	590					595				600						605	
50	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	768
	His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	
					610					615					620		
55	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC	AGT	GGT	AAT	CTA	816
	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	
				625					630					635			
	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	864
	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	
			640					645					650				

5	GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His 655 660 665	912
	CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr 670 675 680 685	960
10	AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA TAT TTC Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe 690 695 700	1008
15	ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Asp Leu Lys Ala Leu Lys Glu Lys 705 710 715	1056
20	CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys 720 725 730	1104
25	GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA Ala Leu Val Gly Glu Arg * * 735 740	1128
(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:		
30	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE: (A) LONGUEUR: 765 paires de bases (B) TYPE: nucléotide (C) NOMBRE DE BRINS: simple (D) CONFIGURATION: linéaire	
35	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc	
	(iii) HYPOTHETIQUE: NON	
40	(iv) ANTI-SENS: NON	
	(ix) CARACTERISTIQUE: (A) NOM/CLE: CDS (B) EMBLACEMENT: 1..765	
45	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:	
50	ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His 380 385 390	48
55	TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp 395 400 405	96
	TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe 410 415 420	144

5	ACC Thr 425	CCC Pro	CAC His	GAC Asp	TCC Ser	GCC Ala 430	CCC Pro	TAC Tyr	GGC Gly	GCT Ala	CTG Leu 435	GAT Asp	ATG Met	GCC Ala	GAC Asp	TTC Phe 440	192
	GAG Glu	TTT Phe	GAG Glu	CAG Gln	ATG Met 445	TTT Phe	ACC Thr	GAT Asp	GCC Ala	CTT Leu 450	GGA Gly	ATT Ile	GAC Asp	GAG Glu	TAC Tyr 455	240	
	GGT Gly	CGA Arg	CCT Pro	GCA Ala 460	CCA Pro	GCA Ala	GCT Ala	CCT Pro	ACA Thr 465	CCG Pro	GCG Ala	GCC Ala	CCT Pro	GCA Ala 470	CCA Pro	GCC Ala	288
15	CCC Pro	TCC Ser	TGG Trp 475	CCC Pro	CTG Leu	TCA Ser	TCT Ser 480	TCT Ser	GTC Val	CCT Pro	TCC Ser	CAG Gln	AAA Lys 485	ACC Thr	TAC Tyr	CAG Gln	336
	GGC Gly	AGC Ser 490	TAC Tyr	GGT Gly	TTC Phe	CGT Arg	CTG Leu 495	GGC Gly	TTC Phe	TTG Leu	CAT His	TCT Ser 500	GGG Gly	ACA Thr	GCC Ala	AAG Lys	384
	TCT Ser 505	GTG Val	ACT Thr	TGC Cys	ACG Thr	TAC Tyr 510	TCC Ser	CCT Pro	GCC Ala	CTC Leu	AAC Asn 515	AAG Lys	ATG Met	TTT Phe	TGC Cys	CAA Gln 520	432
25	CTG Leu	GCC Ala	AAG Lys	ACC Thr	TGC Cys 525	CCT Pro	GTG Val	CAG Gln	CTG Leu	TGG Trp 530	GTT Val	GAT Asp	TCC Ser	ACA Thr	CCC Pro 535	CCG Pro	480
	CCC Pro	GGC Gly	ACC Thr	CGC Arg 540	GTC Val	CGC Arg	GCC Ala	ATG Met	GCC Ala 545	ATC Ile	TAC Tyr	AAG Lys	CAG Gln	TCA Ser 550	CAG Gln	CAC His	528
	ATG Met 555	ACG Thr	GAG Glu	GTT Val	GTG Val	AGG Arg	CGC Arg	TGC Cys 560	CCC Pro	CAC His	CAT His	GAG Glu	CGC Arg 565	TGC Cys	TCA Ser	GAT Asp	576
40	AGC Ser 570	GAT Asp	GGT Gly	CTG Leu	GCC Ala	CCT Pro	CCT Pro 575	CAG Gln	CAT His	CTT Leu	ATC Ile	CGA Arg 580	GTG Val	GAA Glu	GGA Gly	AAT Asn	624
	TTG Leu 585	CGT Arg	GTG Val	GAG Glu	TAT Tyr	TTC Phe 590	ACC Thr	CTT Leu	CAG Gln	ATC Ile	CGT Arg 595	GGG Gly	CGT Arg	GAG Glu	CGC Arg	TTC Phe 600	672
	GAG Glu	ATG Met	TTC Phe	CGA Arg 605	GAG Glu 610	CTG Leu	AAT Asn	GAG Glu	GCC Ala	TTG Leu 610	GAA Glu	CTC Leu	AAG Lys	GAT Asp	GCC Ala 615	CAG Gln	720
50	GCT Ala	GGG Gly	AAG Lys	GAG Glu 620	CCA Pro	GGG Gly	GGG Gly	AGC Ser	AGG Arg 625	GCT Ala	CAC His	TCG Ser	AGC Ser	TGA *	TGA *		765

55 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 816 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMBLACEMENT: 1..816

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

5	ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC ACC CTG GGG GAC GAG CTC CAC	48
10	Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
	260 265 270	
15	TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
20	Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
	275 280 285	
25	TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT	144
	Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
	290 295 300	
30	ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC	192
	Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe	
	305 310 315	
35	GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT	240
	Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly	
	320 325 330 335	
40	GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC	288
	Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala	
	340 345 350	
45	CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG	336
	Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln	
	355 360 365	
50	GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG	384
	Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys	
	370 375 380	
55	TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA	432
	Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln	
	385 390 395	
60	CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG	480
	Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro	
	400 405 410 415	
65	CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC	528
	Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His	

				420					425					430				
		ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	576
5		Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	
				435					440					445				
		AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	624
10		Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	
				450					455					460				
		TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	672
		Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Phe	
			465					470					475					
15		GAG	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	720
		Glu	Met	Phe	Arg	Glu	Leu	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	
			480				485					490					495	
20		GCT	GGG	AAG	GAG	CCA	GGG	GGG	AGC	AGG	GCT	CAC	TCG	AGC	CTG	CAG	CCT	768
		Ala	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Ala	His	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
					500						505					510		
25		AGA	GCC	TTC	CAA	GCC	CTC	ATG	AAG	GAG	GAA	AGC	CCA	AAC	TGC	TGA	TGA	816
		Arg	Ala	Phe	Gln	Ala	Leu	Met	Lys	Glu	Glu	Ser	Pro	Asn	Cys	*	*	
				515						520					525			

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1209 paires de bases
 (B) TYPE: nucleotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 35 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

40 (iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

- 45 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMLACEMENT: 1..1209

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

50	ATG	TCC	ACG	GCC	CCC	CCG	ACC	GAT	GTC	AGC	CTG	GGG	GAC	GAG	CTC	CAC	48
	Met	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	
			275					280					285				
55	TTA	GAC	GGC	GAG	GAC	GTG	GCG	ATG	GCG	CAT	GCC	GAC	GCG	CTA	GAC	GAT	96
	Leu	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Met	Ala	His	Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	
		290					295					300					
	TTC	GAT	CTG	GAC	ATG	TTG	GGG	GAC	GGG	GAT	TCC	CCG	GGG	CCG	GGA	TTT	144
	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	

	305	310	315	320	
5	ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe 325 330 335				192
10	GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly 340 345 350				240
15	GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala 355 360 365				288
20	CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln 370 375 380				336
25	GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys 385 390 395 400				384
30	TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln 405 410 415				432
35	CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro 420 425 430				480
40	CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His 435 440 445				528
45	ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp 450 455 460				576
50	AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn 465 470 475 480				624
55	TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val 485 490 495				672
60	GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile 500 505 510				720
65	CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg 515 520 525				768
70	AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu 530 535 540				816
75	CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA				864

	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	
	545					550					555					560	
5	GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	912
	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	
					565					570					575		
10	CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	960
	His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	
				580					585					590			
15	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	1008
	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Phe	
				595				600					605				
	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	1056
	Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Phe	Glu	Met	Phe	Arg	Glu	Leu	
		610				615						620					
20	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	GGG	AAG	GAG	CCA	GGG	1104
	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	
	625					630					635					640	
25	GGG	AGC	AGG	GCT	CAC	TCC	AGC	CAC	CTG	AAG	TCC	AAA	AAG	GGT	CAG	TCT	1152
	Gly	Ser	Arg	Ala	His	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	
					645					650					655		
30	ACC	TCC	CGC	CAT	AAA	AAA	CTC	ATG	TTC	AAG	ACA	GAA	GGG	CCT	GAC	TCA	1200
	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Leu	Met	Phe	Lys	Thr	Glu	Gly	Pro	Asp	Ser	
				660					665					670			
35	GAC	TGA	TGA														1209
	Asp	*	*														
				675													

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1149 paires de bases
 (B) TYPE: nucl,otide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: lin,aire

- 45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- 50 (iv) ANTI-SENS: NON

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 1..1149

55

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

ATG GCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC

48

	Met	Ala	Thr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	
	1				5					10					15		
5	TTA	GAC	GGC	GAG	GAC	GTG	GCG	ATG	GCG	CAT	GCC	GAC	GCG	CTA	GAC	GAT	96
	Leu	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Met	Ala	His	Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	
				20					25					30			
10	TTC	GAT	CTG	GAC	ATG	TTG	GGG	GAC	GGG	GAT	TCC	CCG	GGG	CCG	GGA	TTT	144
	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	
			35					40					45				
15	ACC	CCC	CAC	GAC	TCC	GCC	CCC	TAC	GGC	GCT	CTG	GAT	ATG	GCC	GAC	TTC	192
	Thr	Pro	His	Asp	Ser	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Asp	Phe	
			50				55					60					
20	GAG	TTT	GAG	CAG	ATG	TTT	ACC	GAT	GCC	CTT	GGA	ATT	GAC	GAG	TAC	GGT	240
	Glu	Phe	Glu	Gln	Met	Phe	Thr	Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Glu	Tyr	Gly	
	65					70					75					80	
25	GGT	CGA	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	CCT	GCA	CCA	GCC	288
	Gly	Arg	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	
					85					90					95		
30	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	AAA	ACC	TAC	CAG	336
	Pro	Ser	Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Gln	Lys	Thr	Tyr	Gln	
				100					105					110			
35	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	GCC	AAG	384
	Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys	
			115					120					125				
40	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	432
	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Met	Phe	Cys	Gln	
		130					135					140					
45	CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	480
	Leu	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	
	145					15					155					160	
50	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	528
	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	
					165					170					175		
55	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	576
	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	
				180					185					190			
60	AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	624
	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	
			195					200					205				
65	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	672
	Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	
		210					215					220					
70	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TCT	ACC	ACC	ATC	720
	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Ile	
	225					230					235					240	

	CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG	768
	His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg	
	245 250 255	
5	AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA	816
	Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu	
	260 265 270	
10	CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA	864
	Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg	
	275 280 285	
15	GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC	912
	Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His	
	290 295 300	
20	CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC	960
	His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr	
	305 310 315 320	
	AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA TAT TTC	1008
	Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe	
	325 330 335	
25	ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG ATG TTC CGA GAG GAT	1056
	Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Asp	
	340 345 350	
30	CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG	1104
	Leu Lys Ala Leu Lys Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys	
	355 360 365	
35	GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA	1149
	Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Val Gly Glu Arg * *	
	370 375 380	

12. INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

- 40 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1611 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 45 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (III) HYPOTHETIQUE: NON
- 50 (IV) ANTI-SENS: NON
- (IX) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..1611
- 55 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

	ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCA GGG GCA GAG CTT GTG GGG TCA MET ALA GLN VAL GLN LEU GLN GLU SER GLY ALA GLU LEU VAL GLY SER 1 5 10 15	48
5	GGG GCC TCA GTC AAG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GLY ALA SER VAL LYS LEU SER CYS THR ALA SER GLY PHE ASN ILE LYS 20 25 30	96
10	GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG GAG ASP TYR TYR MET HIS TRP VAL LYS GLN ARG PRO GLU GLN GLY LEU GLU 35 40 45	144
15	TGG ATT GGA TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT GAT ACT GAA TAT GCC CCG TRP ILE GLY TRP ILE ASP PRO GLU ASN GLY ASP THR GLU TYR ALA PRO 50 55 60	192
20	AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AAT ACA LYS PHE GLN GLY LYS ALA THR MET THR ALA ASP THR SER SER ASN THR 65 70 75 80	240
	GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG GCA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT ALA TYR LEU GLN LEU SER SER LEU ALA SER GLU ASP THR ALA VAL TYR 85 90 95	288
25	TAT TGT AAT TTT TAC GGG GAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC TYR CYS ASN PHE TYR GLY ASP ALA LEU ASP TYR TRP GLY GLN GLY THR 100 105 110	336
30	ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT THR VAL THR VAL SER SER GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER 115 120 125	384
35	GGC GGT GGC GGA TCG GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC ACT TTG GLY GLY GLY GLY SEP ASP VAL LEU MET THP GLN THR PRO LEU THR LEU 130 135 140	432
40	TCG GTT ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG SER VAL THR ILE GLY GLN PRO ALA SER ILE SEP CYS LYS SER SER GLN 145 150 155 160	480
	AGC CTC TTG GAT AGT GAT GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG TTG TTA CAG SER LEU LEU ASP SER ASP GLY LYS THR TYR LEU ASN TRP LEU LEU GLN 165 170 175	528
45	AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG TCT AAA CTG ARG PRO GLY GLN SER PRO LYS ARG LEU ILE TYR LEU VAL SER LYS LEU 180 185 190	576
50	GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT ASP SER GLY VAL PRO ASP ARG PHE THR GLY SER GLY SER GLY THR ASP 195 200 205	624
55	TTC ACA CTG AAA ATC AAC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT PHE THR LEU LYS ILE ASN ARG VAL GLU ALA GLU ASP LEU GLY VAL TYR 210 215 220	672
	TAT TGC TGG CAA GGT ACA CAT TCT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC TYR CYS TRP GLN GLY THR HIS SER PRO LEU THR PHE GLY ALA GLY THR 225 230 235 240	720

5	AAG LYS	CTG LEU	GAG GLU	CTG LEU	AAA LYS	CGG ARG	GCG ALA	GCC ALA	GCA ALA	TTG LEU	CAG GLN	ACG THR	CGT ARG	CGA ARG	CCT PRO	GCA ALA	768
	.245								250				255				
10	CCA PRO	GCA ALA	GCT ALA	CCT PRO	ACA THR	CCG PRO	GCG ALA	GCC ALA	CCT PRO	GCA ALA	CCA PRO	GCC ALA	CCC PRO	TCC SER	TGG TRP	CCC PRO	816
	260								265				270				
15	CTG LEU	TCA SER	TCT SER	TCT SER	GTC VAL	CCT PRO	TCC SER	CAG GLN	AAA LYS	ACC THR	TAC TYR	CAG GLN	GGC GLY	AGC SER	TAC TYR	GGT GLY	864
	275								280				285				
20	TTC PHE	CGT ARG	CTG LEU	GGC GLY	TTC PHE	TTG LEU	CAT HIS	TCT SER	GGG GLY	ACA THR	GCC ALA	AAG LYS	TCT SER	GTG VAL	ACT THR	TGC CYS	912
	290								295				300				
25	ACG THR	TAC TYR	TCC SER	CCT PRO	GCC ALA	CTC LEU	AAC ASN	AAG LYS	ATG MET	TTT PHE	TGC CYS	CAA GLN	CTG LEU	GCC ALA	AAG LYS	ACC THR	960
	305								310				315				320
30	TGC CYS	CCT PRO	GTG VAL	CAG GLN	CTG LEU	TGG TRP	GTT VAL	GAT ASP	TCC SER	ACA THR	CCC PRO	CCG PRO	CCC PRO	GGC GLY	ACC THR	CGC ARG	1008
	325								330				335				
35	GTC VAL	CGC ARG	GCC ALA	ATG MET	GCC ALA	ATC ILE	TAC TYR	AAG LYS	CAG GLN	TCA SER	CAG GLN	CAC HIS	ATG MET	ACG THR	GAG GLU	GTT VAL	1056
	340								345				350				
40	GTG VAL	AGG ARG	CGC ARG	TGC CYS	CCC PRO	CAC HIS	CAT HIS	GAG GLU	CGC ARG	TGC CYS	TCA SER	GAT ASP	AGC SER	GAT ASP	GGT GLY	CTG LEU	1104
	355								360				365				
45	GCC ALA	CCT PRO	CCT PRO	CAG GLN	CAT HIS	CTT LEU	ATC ILE	CGA ARG	GTG VAL	GAA GLU	GGA GLY	AAT ASN	TTG LEU	CGT ARG	GTG VAL	GAG GLU	1152
	370								375				380				
50	TAT TYR	TTG LEU	GAT ASP	GAC ASP	AGA ARG	AAC ASN	ACT THR	TTT PHE	CGA ARG	CAT HIS	AGT SER	GTG VAL	GTG VAL	GTG VAL	CCC PRO	TAT TYR	1200
	385								390				395				400
55	GAG GLU	CCG PRO	CCT PRO	GAG GLU	GTT VAL	GGC GLY	TCT SER	GAC ASP	TGT CYS	ACC THR	ACC THR	ATC ILE	CAC HIS	TAC TYR	AAC ASN	TAC TYR	1248
	405								410				415				
60	ATG MET	TGT CYS	AAC ASN	AGT SER	TCC SER	TGC CYS	ATG MET	GGC GLY	GGC GLY	ATG MET	AAC ASN	CGG ARG	AGG ARG	CCC PRO	ATC ILE	CTC LEU	1296
	420								425				430				
65	ACC THR	ATC ILE	ATC ILE	ACA THR	CTG LEU	GAA GLU	GAC ASP	TCC SER	AGT SER	GGT GLY	AAT ASN	CTA LEU	CTG LEU	GGA GLY	CGG ARG	AAC ASN	1344
	435								440				445				
70	AGC SER	TTT PHE	GAG GLU	GTG VAL	CGT ARG	GTT VAL	TGT CYS	GCC ALA	TGT CYS	CCT PRO	GGG GLY	AGA ARG	GAC ASP	CGG ARG	CGC ARG	ACA THR	1392
	450								455				460				
75	GAG GLU	GAA GLU	GAG GLU	AAT ASN	CTC LEU	CGC ARG	AAG LYS	AAA LYS	GGG GLY	GAG GLU	CCT PRO	CAC HIS	CAC HIS	GAG GLU	CTG LEU	CCC PRO	1440

	465		470		475		480	
5	CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC							1488
	PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU PRO ASN ASN THR SER SER SER PRO							
		485			490		495	
10	CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG							1536
	GLN PRO LYS LYS LYS PRO LEU ASP GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU							
		500			505		510	
15	AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG							1584
	LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU							
		515			520		525	
20	AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA							1611
	LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG * *							
		530			535			
20	(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:							
	(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:							
	(A) LONGUEUR: 1065 paires de bases							
25	(B) TYPE: nucléotide							
	(C) NOMBRE DE BRINS: simple							
	(D) CONFIGURATION: linéaire							
	(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC							
30	(III) HYPOTHETIQUE: NON							
	(IV) ANTI-SENS: NON							
35	(IX) CARACTERISTIQUE:							
	(A) NOM/CLE: CDS							
	(E) EMBLEMMENT: 1..1065							
40	(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:							
	ATG GGA GAA TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG							48
	MET GLY GLU TYR PHE THR LEU GLN ILE ARG GLY ARG GLU ARG PHE GLU							
45	1		5			10		15
	ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG GCT							96
	MET PHE ARG GLU LEU ASN GLU ALA LEU GLU LEU LYS ASP ALA GLN ALA							
		20				25		30
50	GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT CAC TCC AGC CAC CTG AAG TCC							144
	GLY LYS GLU PRO GLY GLY SER ARG ALA HIS SER SER HIS LEU LYS SER							
		35				40		45
55	AAA AAG GGT CAG TCT ACC TCC CGC CAT AAA AAA CTC ATG TTC AAG ACA							192
	LYS LYS GLY GLN SER THR SER ARG HIS LYS LYS LEU MET PHE LYS THR							
		50				55		60
	GAA GGG CCT GAC TCA GAC GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG							240
	GLU GLY PRO ASP SER ASP GLY ARG PRO ALA PRO ALA ALA PRO THR PRO							

	65			70				75				80					
5	GCG ALA	GCC ALA	CCT PRO	GCA ALA	CCA PRO	GCC ALA	CCC PRO	TCC SER	TGG TRP	CCC PRO	CTG LEU	TCA SER	TCT SER	TCT SER	GTC VAL	CCT PRO	288
					85					90					95		
10	TCC SER	CAG GLN	AAA LYS	ACC THR	TAC TYR	CAG GLN	GGC GLY	AGC SER	TAC TYR	GGT GLY	TTC PHE	CGT ARG	CTG LEU	GGC GLY	TTC PHE	TTG LEU	336
				100				105						110			
	CAT HIS	TCT SER	GGG GLY	ACA THR	GCC ALA	AAG LYS	TCT SER	GTG VAL	ACT THR	TGC CYS	ACG THR	TAC TYR	TCC SER	CCT PRO	GCC ALA	CTC LEU	384
			115					120					125				
15	AAC ASN	AAG LYS	ATG MET	TTT PHE	TGC CYS	CAA GLN	CTG LEU	GCC ALA	AAG LYS	ACC THR	TGC CYS	CCT PRO	GTG VAL	CAG GLN	CTG LEU	TGG TRP	432
			130				135					140					
20	GTT VAL	GAT ASP	TCC SER	ACA THR	CCC PRO	CCG PRO	CCC PRO	GGC GLY	ACC THR	CGC ARG	GTC VAL	CGC ARG	GCC ALA	ATG MET	GCC ALA	ATC ILE	480
						150					155					160	
25	TAC TYR	AAG LYS	CAG GLN	TCA SER	CAG GLN	CAC HIS	ATG MET	ACG THR	GAG GLU	GTT VAL	GTG VAL	AGG ARG	CGC ARG	TGC CYS	CCC PRO	CAC HIS	528
					165					170					175		
30	CAT HIS	GAG GLU	CGC ARG	TGC CYS	TCA SER	GAT ASP	AGC SER	GAT ASP	GGT GLY	CTG LEU	GCC ALA	CCT PRO	CCT PRO	CAG GLN	CAT HIS	CTT LEU	576
				180					185					190			
	ATC ILE	CGA ARG	GTG VAL	GAA GLU	GGA GLY	AAT ASN	TTG LEU	CGT ARG	GTG VAL	GAG GLU	TAT TYR	TTG LEU	GAT ASP	GAC ASP	AGA ARG	AAC ASN	624
			195				200						205				
35	ACT THR	TTT PHE	CGA ARG	CAT HIS	AST SER	GTG VAL	GTG VAL	GTG VAL	CCC PRO	TAT TYR	GAG GLU	CCG PRO	CCT PRO	GAG GLU	GTT VAL	GGC GLY	672
		210				215						220					
40	TCT SER	GAC ASP	TGT CYS	ACC THR	ACC THR	ATC ILE	CAC HIS	TAC TYR	AAC ASN	TAC TYR	ATG MET	TGT CYS	AAC ASN	AGT SER	TCC SER	TGC CYS	720
		225				230					235					240	
45	ATG MET	GGC GLY	GGC GLY	ATG MET	AAC ASN	CGG ARG	AGG ARG	CCC PRO	ATC ILE	CTC LEU	ACC THR	ATC ILE	ATC ILE	ACA THR	CTG LEU	GAA GLU	768
					245					250					255		
50	GAC ASP	TCC SER	AGT SER	GGT GLY	AAT ASN	CTA LEU	CTG LEU	GGA GLY	CGG ARG	AAC ASN	AGC SER	TTT PHE	GAG GLU	GTG VAL	CGT ARG	GTT VAL	816
				260				265						270			
	TGT CYS	GCC ALA	TGT CYS	CCT PRO	GGG GLY	AGA ARG	GAC ASP	CGG ARG	CGC ARG	ACA THR	GAG GLU	GAA GLU	GAG GLU	AAT ASN	CTC LEU	CGC ARG	864
			275				280						285				
55	AAG LYS	AAA LYS	GGG GLY	GAG GLU	CCT PRO	CAC HIS	CAC HIS	GAG GLU	CTG LEU	CCC PRO	CCA PRO	GGG GLY	AGC SER	ACT THR	AAG LYS	CGA ARG	912
		290				295						300					
	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	960

	ALA	LEU	PRO	ASN	ASN	THR	SER	SER	SER	PRO	GLN	PRO	LYS	LYS	LYS	PRO	
	305					310					315					320	
5	CTG	GAT	GGG	GAT	CTG	AAG	GCC	CTC	AAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	1008
	LEU	ASP	GLY	ASP	LEU	LYS	ALA	LEU	LYS	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	
					325					330					335		
10	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCA	CTA	GTG	GGG	GAG	1056
	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	VAL	GLY	GLU	
					340				345					350			
	CGA	TGA	TGA														
	ARG	*	*														1065
15					355												

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 963 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

(IX) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 1..963

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

40	ATG	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	48
	MET	GLY	GLU	TYR	PHE	THR	LEU	GLN	ILE	ARG	GLY	ARG	GLU	ARG	PHE	GLU	
	1				5					10					15		
45	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	96
	MET	PHE	ARG	GLU	LEU	ASN	GLU	ALA	LEU	GLU	LEU	LYS	ASP	ALA	GLN	ALA	
				20				25						30			
50	GGG	AAG	GAG	CCA	GGT	CGA	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	144
	GLY	LYS	GLU	PRO	GLY	ARG	PRO	ALA	PRO	ALA	ALA	PRO	THR	PRO	ALA	ALA	
			35				40					45					
55	CCT	GCA	CCA	GCC	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	192
	PRO	ALA	PRO	ALA	PRO	SER	TRP	PRO	LEU	SER	SER	SER	VAL	PRO	SER	GLN	
		50				55						60					
60	AAA	ACC	TAC	CAG	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	240
	LYS	THR	TYR	GLN	GLY	SER	TYR	GLY	PHE	ARG	LEU	GLY	PHE	LEU	HIS	SER	
	65				70					75						80	
	GGG	ACA	GCC	AAG	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	288

	GLY	THR	ALA	LYS	SER	VAL	THR	CYS	THR	TYR	SER	PRO	ALA	LEU	ASN	LYS	
				85					90						95		
5	ATG	TTT	TGC	CAA	CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	336
	MET	PHE	CYS	GLN	LEU	ALA	LYS	THR	CYS	PRO	VAL	GLN	LEU	TRP	VAL	ASP	
				100					105					110			
10	TCC	ACA	CCC	CCG	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC	AAG	384
	SER	THR	PRO	PRO	PRO	GLY	THR	ARG	VAL	ARG	ALA	MET	ALA	ILE	TYR	LYS	
				115				120					125				
15	CAG	TCA	CAG	CAC	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	432
	GLN	SER	GLN	HIS	MET	THR	GLU	VAL	VAL	ARG	ARG	CYS	PRO	HIS	HIS	GLU	
				130			135					140					
	CGC	TGC	TCA	GAT	AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	480
	ARG	CYS	SER	ASP	SER	ASP	GLY	LEU	ALA	PRO	PRO	GLN	HIS	LEU	ILE	ARG	
						150					155					160	
20	GTG	GAA	GGA	AAT	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	528
	VAL	GLU	GLY	ASN	LEU	ARG	VAL	GLU	TYR	LEU	ASP	ASP	ARG	ASN	THR	PHE	
					165					170					175		
25	CGA	CAT	AGT	GTG	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	576
	ARG	HIS	SER	VAL	VAL	VAL	PRO	TYR	GLU	PRO	PRO	GLU	VAL	GLY	SER	ASP	
				180					185					190			
30	TGT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	ATG	GGC	624
	CYS	THR	THR	ILE	HIS	TYR	ASN	TYR	MET	CYS	ASN	SER	SER	CYS	MET	GLY	
				195				200					205				
35	GGC	ATG	AAC	CGG	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC	672
	GLY	MET	ASN	ARG	ARG	PRO	ILE	LEU	THR	ILE	ILE	THR	LEU	GLU	ASP	SER	
			210				215					220					
	AGT	GGT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	720
	SEP	GLY	ASN	LEU	LEU	GLY	ARG	ASN	SER	PHE	GLU	VAL	ARG	VAL	CYS	ALA	
						230					235					240	
40	TGT	CCT	GGG	AGA	GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	768
	CYS	PRO	GLY	ARG	ASP	ARG	ARG	THR	GLU	GLU	GLU	ASN	LEU	ARG	LYS	LYS	
					245					250					255		
45	GGG	GAG	CCT	CAC	CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	CTG	816
	GLY	GLU	PRO	HIS	HIS	GLU	LEU	PRO	PRO	GLY	SER	THR	LYS	ARG	ALA	LEU	
				260					265					270			
50	CCC	AAC	AAC	ACC	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	864
	PRO	ASN	ASN	THR	SER	SER	SER	PRO	GLN	PRO	LYS	LYS	LYS	PRO	LEU	ASP	
				275				280					285				
55	GGG	GAT	CTG	AAG	GCC	CTC	AAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	912
	GLY	ASP	LEU	LYS	ALA	LEU	LYS	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	GLU	LYS	
			290				295					300					
	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCA	CTA	GTG	GGG	GAG	CGA	TGA	960
	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	VAL	GLY	GLU	ARG	*	
						310					315					320	

TGA

963

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

10

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1011 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

15

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

20

(IX) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 1..1011

25

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

30	ATG GGA GAA TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG MET GLY GLU TYR PHE THR LEU GLN ILE ARG GLY ARG GLU ARG PHE GLU	48
	1 5 10 15	
35	ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG GCT MET PHE ARG GLU LEU ASN GLU ALA LEU GLU LEU LYS ASP ALA GLN ALA	96
	20 25 30	
40	GGG AAG GAG CCA GGT CGA GGA GGT GGT GGC TCT GGA GGC GGA GGA TCC GLY LYS GLU PRO GLY ARG GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY GLY SER	144
	35 40 45	
45	GCC GGT GGA GGT TCT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC GLY GLY GLY GLY SER ARG PRO ALA PRO ALA ALA PRO THR PRO ALA ALA	192
	50 55 60	
50	CCT GCA CCA GCC CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG PRO ALA PRO ALA PRO SER TRP PRO LEU SER SER SER VAL PRO SER GLN	240
	65 70 75 80	
55	AAA ACC TAC CAG GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT LYS THR TYR GLN GLY SER TYR GLY PHE ARG LEU GLY PHE LEU HIS SER	288
	85 90 95	
	GGG ACA GCC AAG TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG GLY THR ALA LYS SER VAL THR CYS THR TYR SER PRO ALA LEU ASN LYS	336
	100 105 110	
	ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTC TCC CTT GAT MET PHE CYS GLN LEU ALA LYS THR CYS PRO VAL GLN LEU TRP VAL ASP	384
	115 120 125	

	TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG SER THR PRO PRO PRO GLY THR ARG VAL ARG ALA MET ALA ILE TYR LYS 130 135 140	432
5	CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL VAL ARG ARG CYS PRO HIS HIS GLU 145 150 155 160	480
10	CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU ALA PRO PRO GLN HIS LEU ILE ARG 165 170 175	528
15	GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU TYR LEU ASP ASP ARG ASN THR PHE 180 185 190	576
20	CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC ARG HIS SER VAL VAL VAL PRO TYR GLU PRO PRO GLU VAL GLY SER ASP 195 200 205	624
	TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC CYS THR THR ILE HIS TYR ASN TYR MET CYS ASN SER SER CYS MET GLY 210 215 220	672
25	GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU THR ILE ILE THR LEU GLU ASP SER 225 230 235 240	720
30	AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN SER PHE GLU VAL ARG VAL CYS ALA 245 250 255	768
35	TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR GLU GLU GLU ASN LEU ARG LYS LYS 260 265 270	816
40	GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU 275 280 285	864
	CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT PRO ASN ASN THR SER SER SER PRO GLN PRO LYS LYS LYS PRO LEU ASP 290 295 300	912
45	GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS 305 310 315 320	960
50	CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA LEU LYS ALA LEU GLU LYS LEU LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG * 325 330 335	1008
55	TGA *	1011

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:
 CGGATCCTCT CGGAACATCT CGAA

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 749 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

40	GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GCAGGAGTCA GGGGCAGAGC TTGTGGGGTC AGGGGCCTCA	60
	GTCAAGTTGT CCTGCACAGC TTCTGGCTTC AACATTAAAG ACTACTATAT GCACTGGGTG	120
45	AAGCAGAGGC CTGAACAGGG CCTGGAGTGG ATTGGATGGA TTGATCCTGA GAATGGTGAT	180
	ACTGAATATG CCCCGAAGTT CCAGGGCAAG GCCACTATGA CTGCAGACAC ATCCTCCAAT	240
	ACAGCCTACC TGCAGCTCAG CAGCCTGGCA TCTGAGGACA CTGCCGTCTA TTATTGTAAT	300
50	TTTTACGGGG ATGCTTTGGA CTA CTGGGGC CAAGGGACCA CGGTACCGT CTCCTCAGGT	360
	GGAGGCGGTT CAGGCGGAGG TGGCTCTGGC GGTGGCGGAT CGGATGTTTT GATGACCCAA	420
55	ACTCCACTCA CTTTGTCGGT TACCATTTGGA CAACCAGCCT CCATCTCTTG CAAGTCAAGT	480
	CAGAGCCTCT TGGATAGTGA TGGAAAGACA TATTTGAATT GGTGTTACA GAGGCCAGGC	540
	CAGTCTCCAA AGCGCCTAAT CTATCTGGTG TCTAACTGG ACTCTGGAGT CCCTGACAGG	600

TTCACTGGCA GTGGATCAGG GACAGATTTC ACACTGAAAA TCAACAGAGT GGAGGCTGAG 660
GATTTGGGAG TTTATTATTG CTGGCAAGGT ACACATTCTC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG 720
5 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG GCGGCCCGC 749

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:

10 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 45 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
15 (D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

20 (IV) ANTI-SENS: NON

25 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTTCA CCCTT 45

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40 (III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

45

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

50 GGGTCGACCT GGCTCCTTCC CAGC 24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 39:

55 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 749 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

5 (IV) ANTI-SENS: NON

10 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTTCA CCCTTCAGAT CCGTGGGCGT 60
15 GAGCGCTTCG AGATGTTCCG AGAGCTGAAT GAGGCCTTGG AACTCAAGGA TGCCCAGGCT 120
GGGAAGGAGC CAGGTCGACC C 141

20 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 40:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
25 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

30 (III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

35

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

40 GGSTCGACCG TGTGAGTCAG GCCCTTC 27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 41:

45 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 749 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

55 (IV) ANTI-SENS: NON

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTTCA CCCTTCAGAT CCGTGGGCGT 60
 5 GAGCGCTTCG AGATGTTCCG AGAGCTGAAT GAGGCCTTGG AACTCAAGGA TGCCCAGGCT 120
 GGGGAAGGAGC CAGGGGGGAG CAGGGCTCAC TCCAGCCACC TGAAGTCCAA AAAGGGTCAG 180
 10 TCTACCTCCC GCCATAAAAA ACTCATGTTC AAGACAGAAG GGCCTGACTC AGACGGTCGA 240
 CCC 243

15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 42:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 20 (D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

25 (III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

30

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

TCGAGGAGGT GGTGGCTCTG GAGGCGGAGG ATCCGGCGGT GGAGGTTT 48

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 43:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
 40 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

45 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

50

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 43:

55 TCGAGAACCC CTACCGCCGG ATCCTCCGCC TCCAGAGCCA CCACCTCC 48

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 44:

100

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 16 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: non
- (v) TYPE DE FRAGMENT: interne
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 44:
- Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 45:
- (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (III) HYPOTHETIQUE: NON
- (IV) ANTI-SENS: NON
- (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 45:
- GATTCGAACA TGTCCCAACA TGTGGA 26
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 46:
- (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (III) HYPOTHETIQUE: NON
- (IV) ANTI-SENS: NON
- (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 46:
- AGCTTCAACA TGTTGGGACA TGGTCG 26

REVENDEICATIONS

1. Variant de la protéine p53 dans lequel tout ou partie du domaine d'oligomérisation est délété et remplacé par un domaine leucine zipper artificiel.
- 5 2. Variant selon la revendication 1 caractérisé en ce que la délétion comprend également tout ou partie du domaine de régulation.
3. Variant selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comporte une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 326.
4. Variant selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comporte une
10 délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 337.
5. Variant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le domaine leucine zipper artificiel est un domaine non présent à l'état naturel assurant une sélectivité d'oligomérisation.
6. Variant selon la revendication 5 caractérisé en ce que le domaine leucine
15 zipper possède la séquence SEQ ID n° 1.
7. Variant selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le résidu arginine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidine.
8. Variant selon l'une des revendications précédentes dans lequel tout ou
20 partie du domaine transactivateur est délété et remplacé par un domaine transactivateur hétérologue.
9. Variant selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comporte une délétion des résidus 1 à 74.
10. Variant selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce que le domaine
25 transactivateur hétérologue est le domaine transactivateur de VP16.

11. Variant selon la revendication 10 caractérisé en ce que le domaine transactivateur comporte la séquence SEQ ID n° 2.
12. Variant selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce que le domaine transactivateur hétérologue est un domaine transactivateur spécifique des
5 cellules transformées.
13. Variant selon la revendication 12 caractérisé en ce que le domaine transactivateur est composé d'un domaine protéique capable de lier sélectivement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.
- 10 14. Variant de la protéine p53 actif préférentiellement dans les cellules transformées dans lequel un au moins des domaines fonctionnels de p53 est délété en tout ou en partie et est substitué par un domaine hétérologue actif préférentiellement dans les cellules transformées.
- 15 15. Variant selon la revendication 14 caractérisé en ce que le domaine fonctionnels de p53 délété et substitué est le domaine transactivateur.
16. Variant selon la revendication 15 comprenant un domaine transactivateur actif préférentiellement dans les cellules contenant une protéine ras oncogénique ou un mutant de p53.
- 20 17. Variant selon la revendication 16 caractérisé en ce que le domaine transactivateur est un domaine protéique capable de lier sélectivement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.
- 25 18. Variant selon la revendication 17 caractérisé en ce que le domaine protéique comprend un fragment ou un dérivé d'anticorps, de préférence un Fab ou un ScFv.

19. Variant selon la revendication 18 caractérisé en ce que le domaine protéique comprend un ScFv dirigé contre un mutant de la protéine p53.
20. Variant selon l'une des revendications 15 à 19 caractérisé en ce que le domaine transactivateur naturel est délété par suppression des résidus 1 à 5 74.
21. Variant de la protéine p53 comprenant une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 366, fusionné à la séquence SEQ ID n° 3 (AS).
22. Variant selon la revendication 21 dans lequel tout ou partie du domaine 10 transactivateur est délété et remplacé par un domaine transactivateur hétérologue.
23. Variant selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que le résidu arginine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidine.
24. Protéine chimère comprenant un domaine transactivateur, un domaine de 15 liaison à l'ADN, un domaine d'adressage au noyau et un domaine d'oligomérisation, caractérisé en ce que les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 325 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 4).
25. Protéine chimère comprenant un domaine transactivateur, un domaine de 20 liaison à l'ADN, un domaine d'adressage au noyau et un domaine d'oligomérisation, caractérisé en ce que les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 336 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 5).
26. Protéine chimère selon la revendication 24 ou 25 caractérisée en ce que 25 le résidu arginine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidine.

27. Protéine chimère selon l'une des revendications 24 à 26 caractérisée en ce que le domaine transactivateur est constitué par le domaine transactivateur de VP16.
- 5 28. Protéine chimère selon l'une des revendications 24 à 27 caractérisée en ce que le domaine transactivateur est constitué par un domaine protéique capable de lier sélectivement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.
- 10 29. Protéine chimère selon l'une des revendications 24 à 28 caractérisée en ce que le domaine d'oligomérisation est constitué par un leucine zipper artificiel.
30. Composé V-325 de séquence SEQ ID n° 25 et son variant V-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.
31. Composé V-336 de séquence SEQ ID n° 26 et son variant V-336H comportant une histidine en position 182 de la p53.
- 15 32. Composé V-367 de séquence SEQ ID n° 27 et son variant V-367H comportant une histidine en position 182 de la p53.
33. Composé V-AS de séquence SEQ ID n° 28 et son variant V-ASH comportant une histidine en position 182 de la p53.
- 20 34. Composé V-393 de séquence SEQ ID n° 29 et son variant V-393H comportant une histidine en position 182 de la p53.
35. Composé V-343 de séquence SEQ ID n° 30 et son variant V-343H comportant une histidine en position 182 de la p53.
36. Composé S-325 de séquence SEQ ID n° 31 et son variant S-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.

37. Composé 393-325 de séquence SEQ ID n° 32 et son variant 393-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.
38. Composé 360-325 de séquence SEQ ID n° 33 et son variant 360-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.
- 5 39. Composé 360h-325 de séquence SEQ ID n° 34 et son variant 360h-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.
40. Acide nucléique codant pour un variant ou une protéine chimère selon l'une des revendications 1 à 39.
- 10 41. Acide nucléique selon la revendication 40 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ADNc, d'un ARN, d'un acide synthétique ou semi-synthétique.
42. Acide nucléique selon la revendication 40 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les acides nucléiques de séquence SEQ ID n° 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 32, 33 et 34
- 15 43. Cassette d'expression comprenant un acide nucléique selon la revendication 40, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription.
44. Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 40 ou une cassette selon la revendication 43.
- 20 45. Vecteur selon la revendication 44 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.
46. Vecteur selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus recombinant défectif.
47. Vecteur selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un rétrovirus recombinant défectif.

48. Vecteur selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un AAV recombinant défectif.
49. Vecteur selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un HSV recombinant défectif.
- 5 50. Vecteur selon la revendication 44 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur chimique ou biochimique.
- 51 Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique et ou un vecteur selon l'une des revendications 35 à 50.
- 10 52. Composition pharmaceutique comprenant un variant ou une protéine chimère selon l'une des revendications 1 à 39.
53. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 51 ou 52 pour le traitement des désordres hyperprolifératifs.

1/18

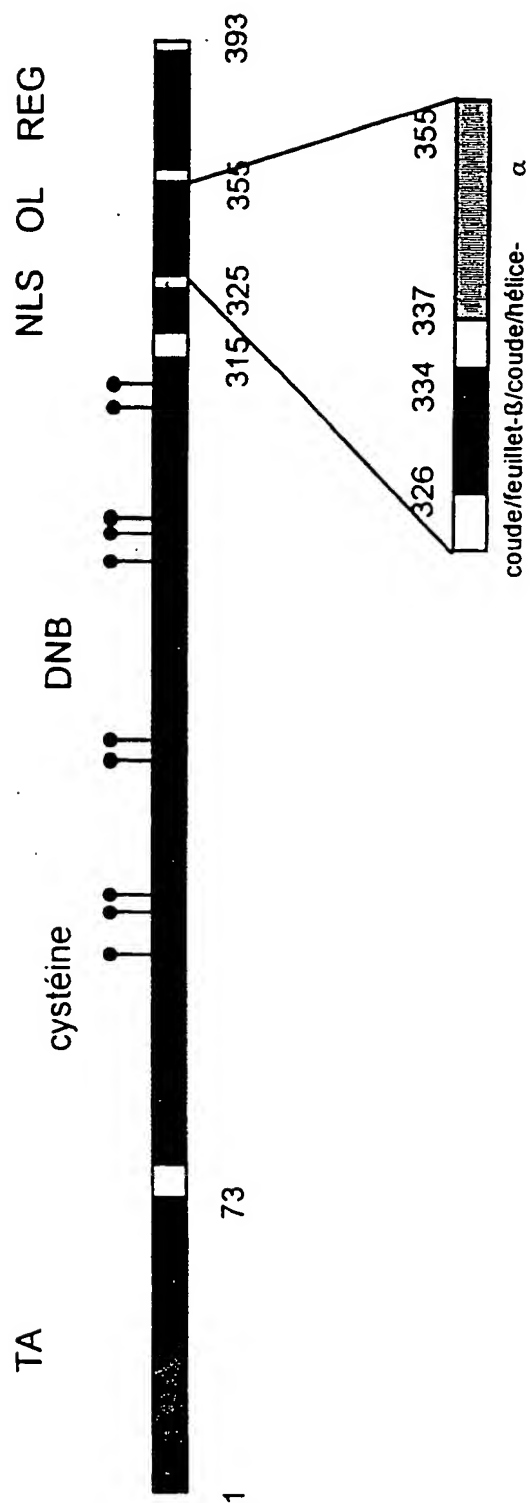


Figure 1

2/18

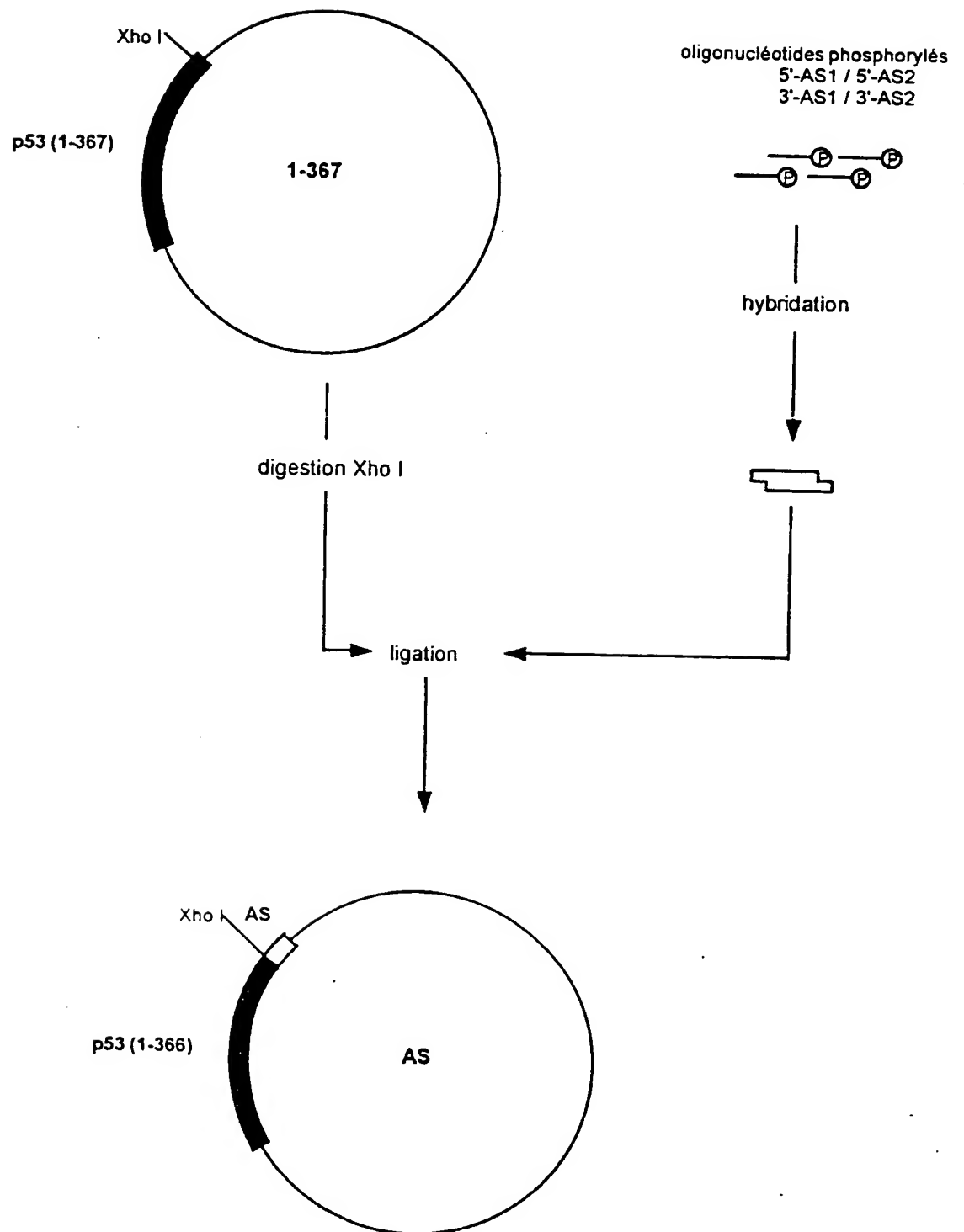


Figure 2

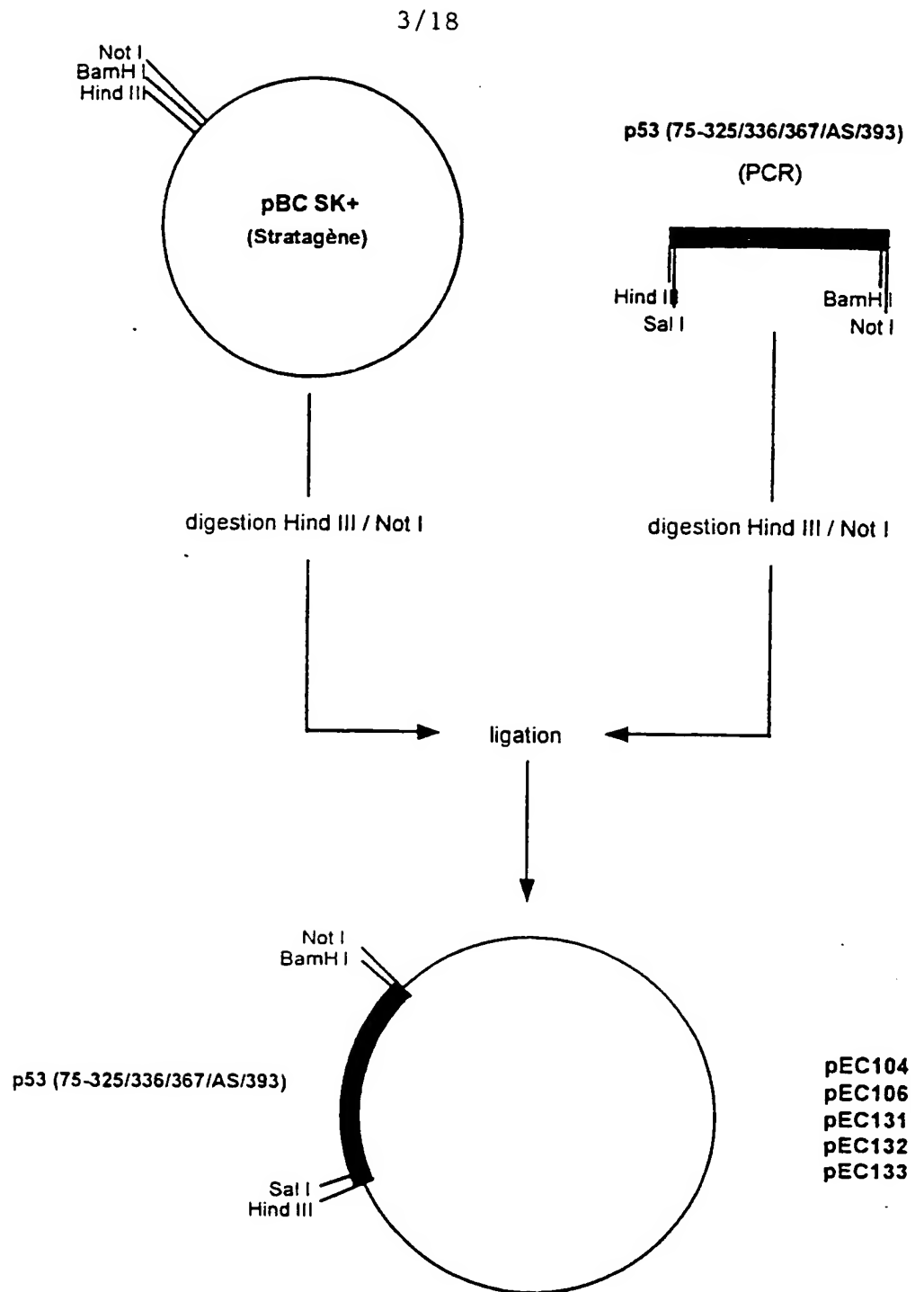


Figure 3

4/18

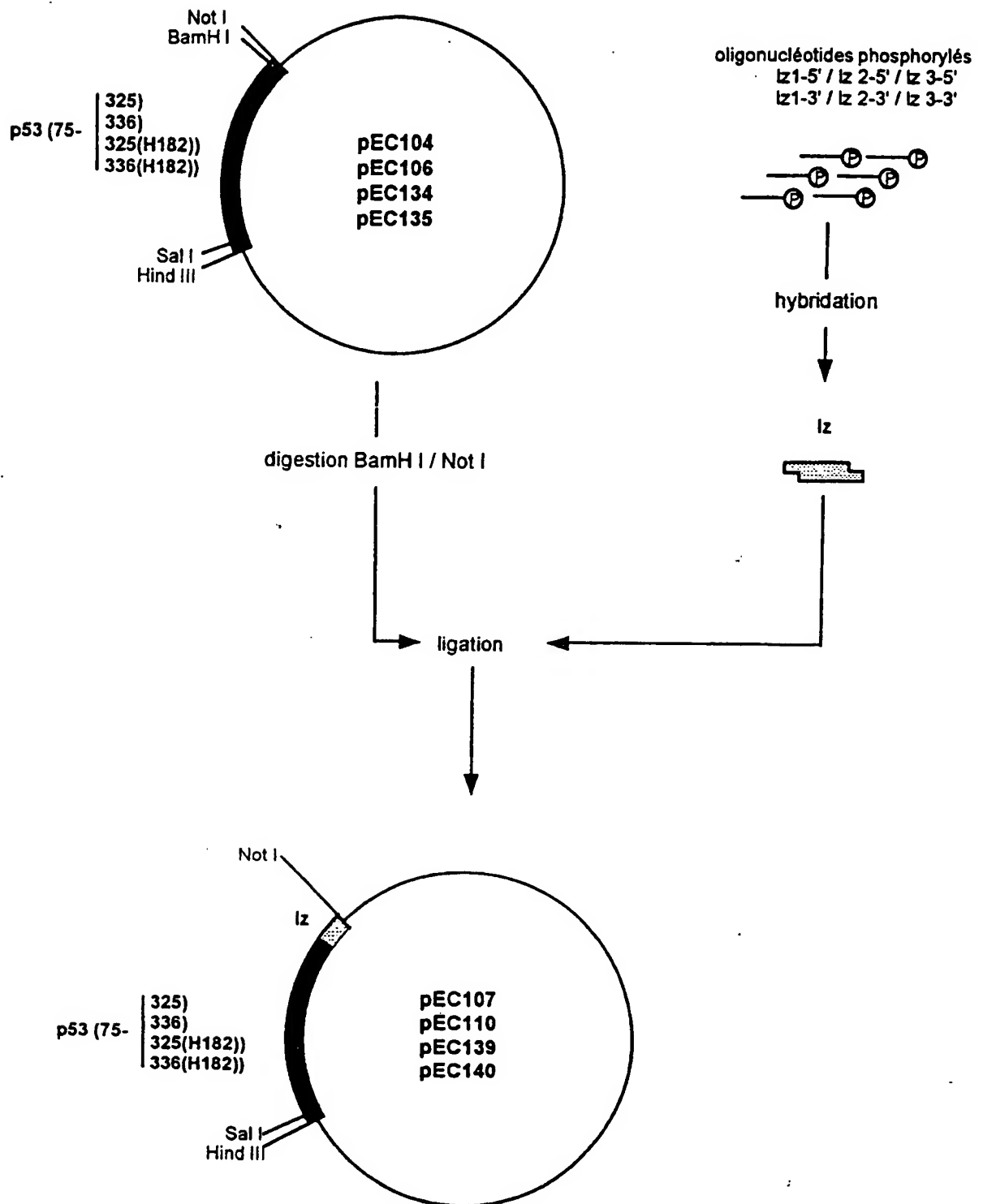


Figure 4

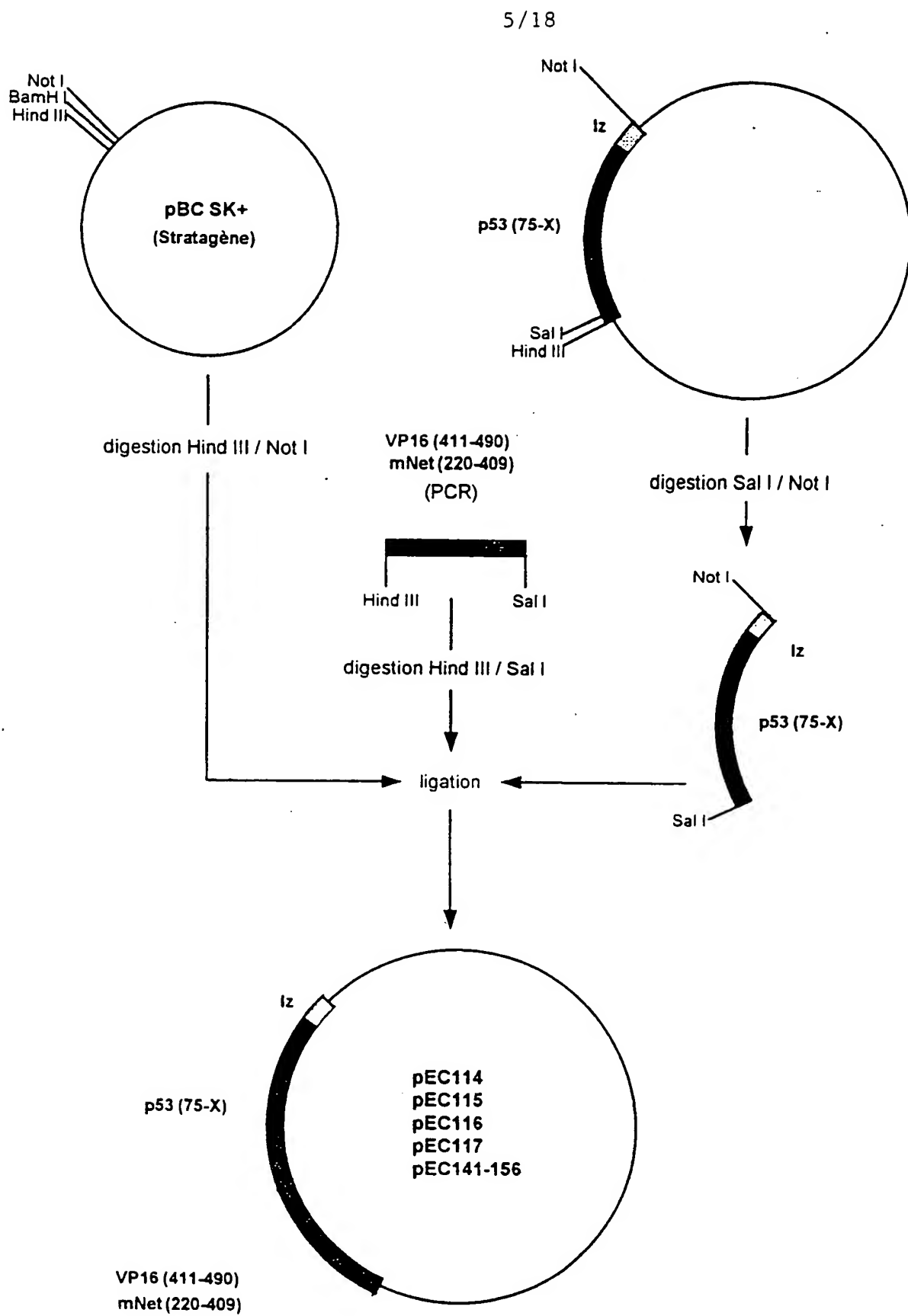


Figure 5

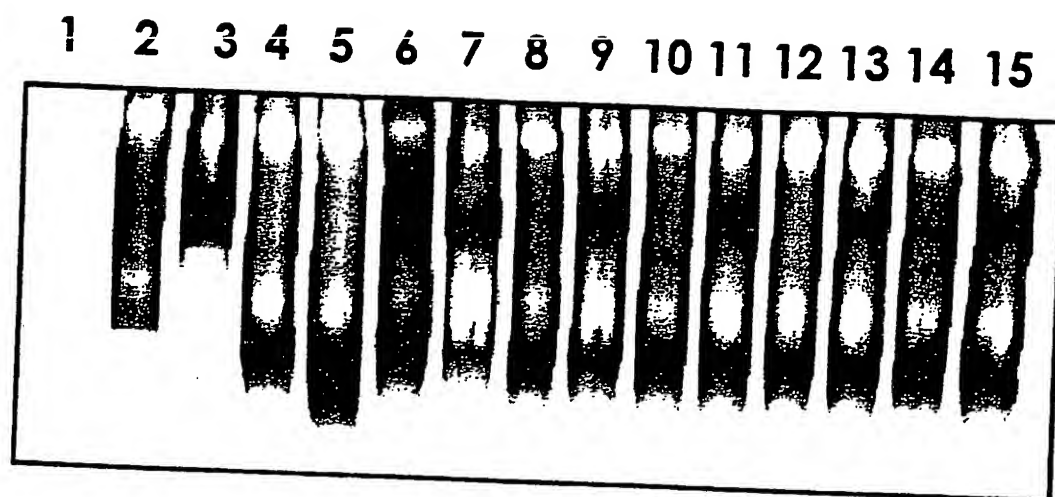


Figure 6

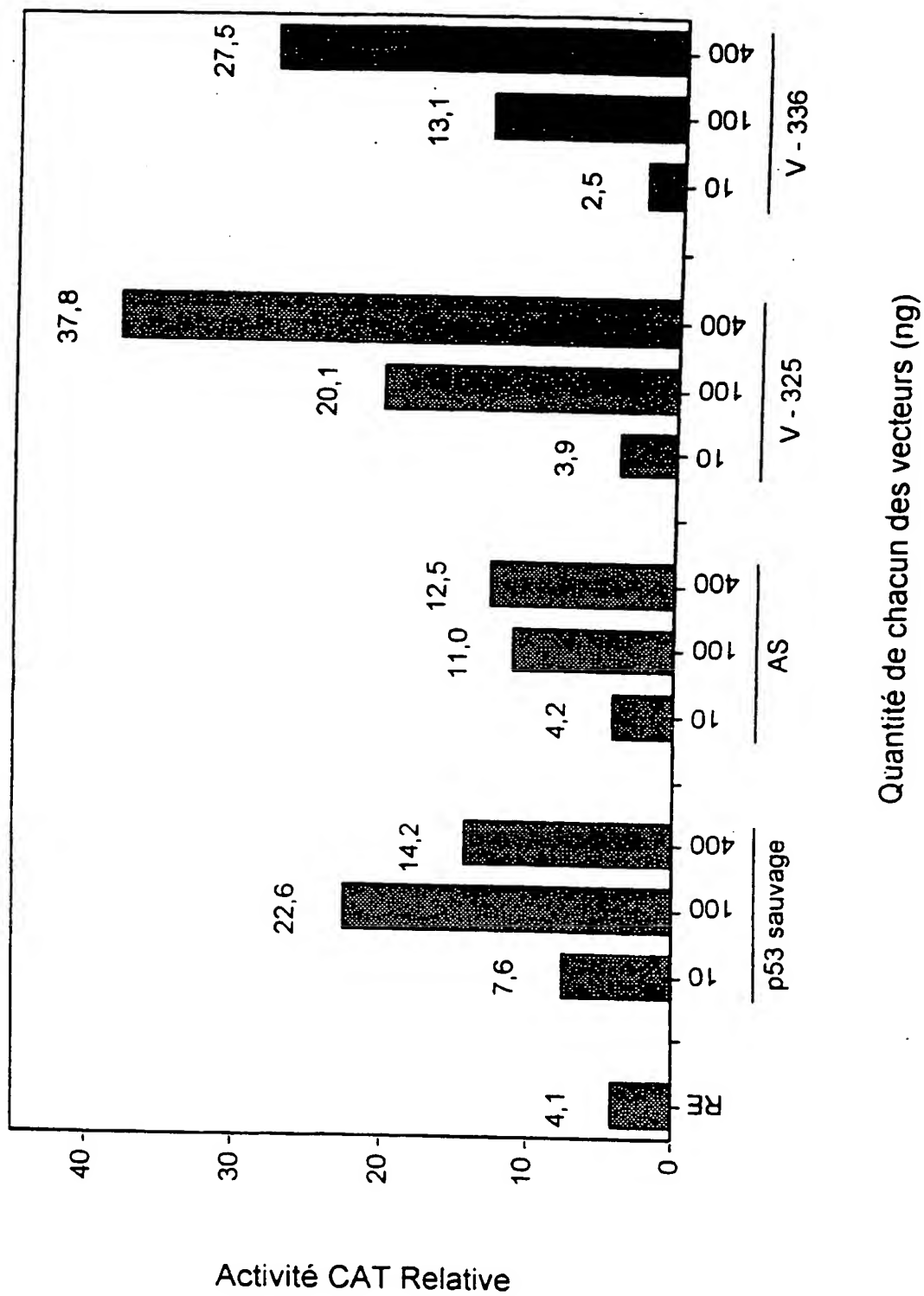


Figure 7

8/18

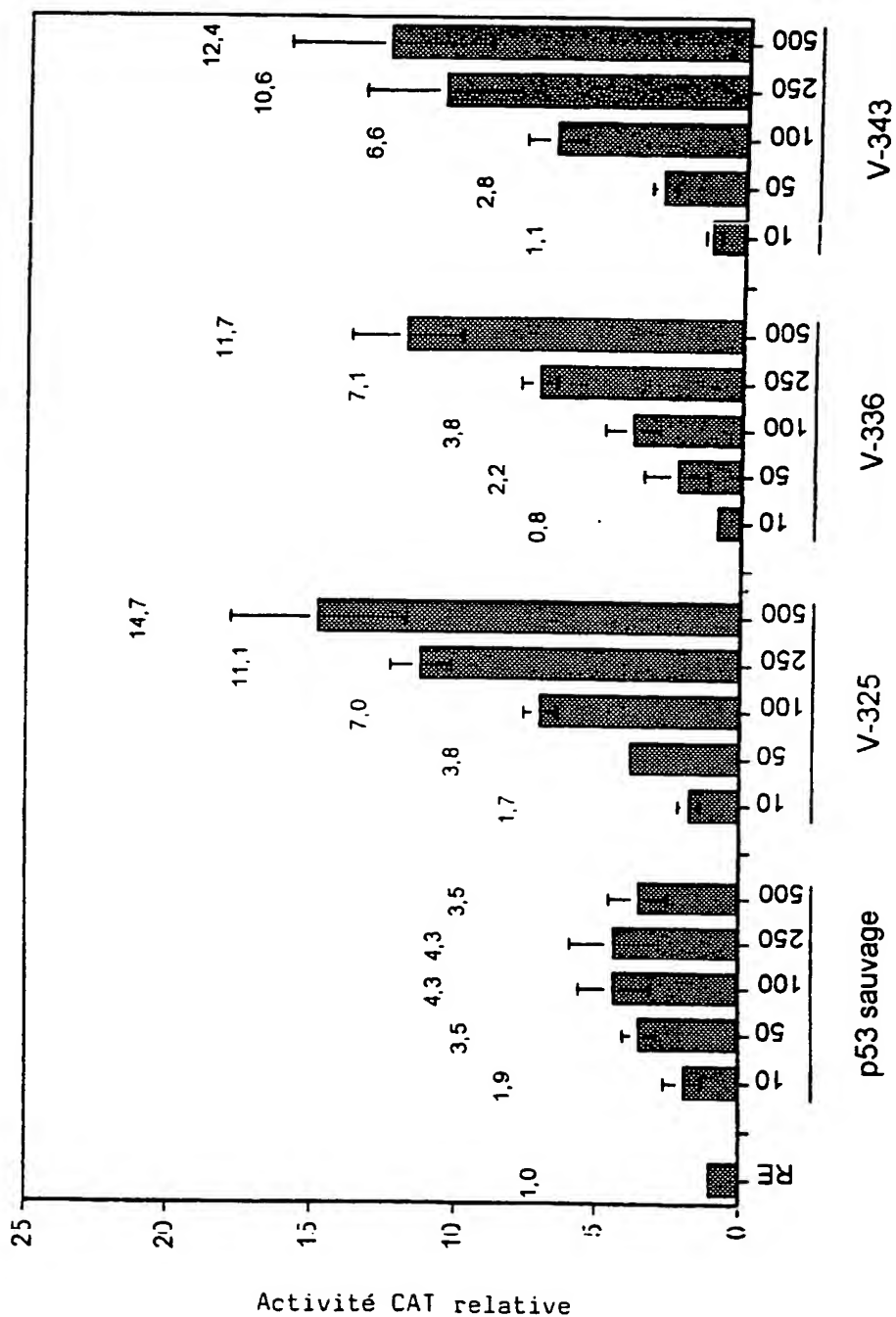


Figure 8

9/18

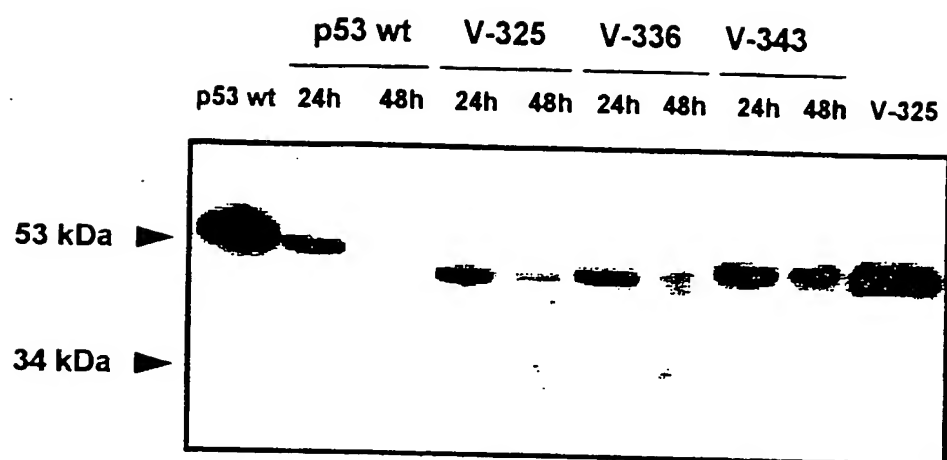


Figure 9

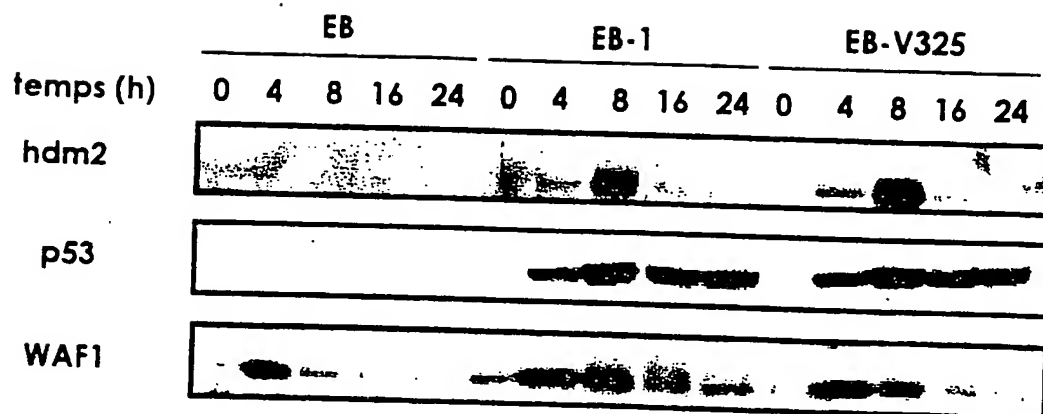
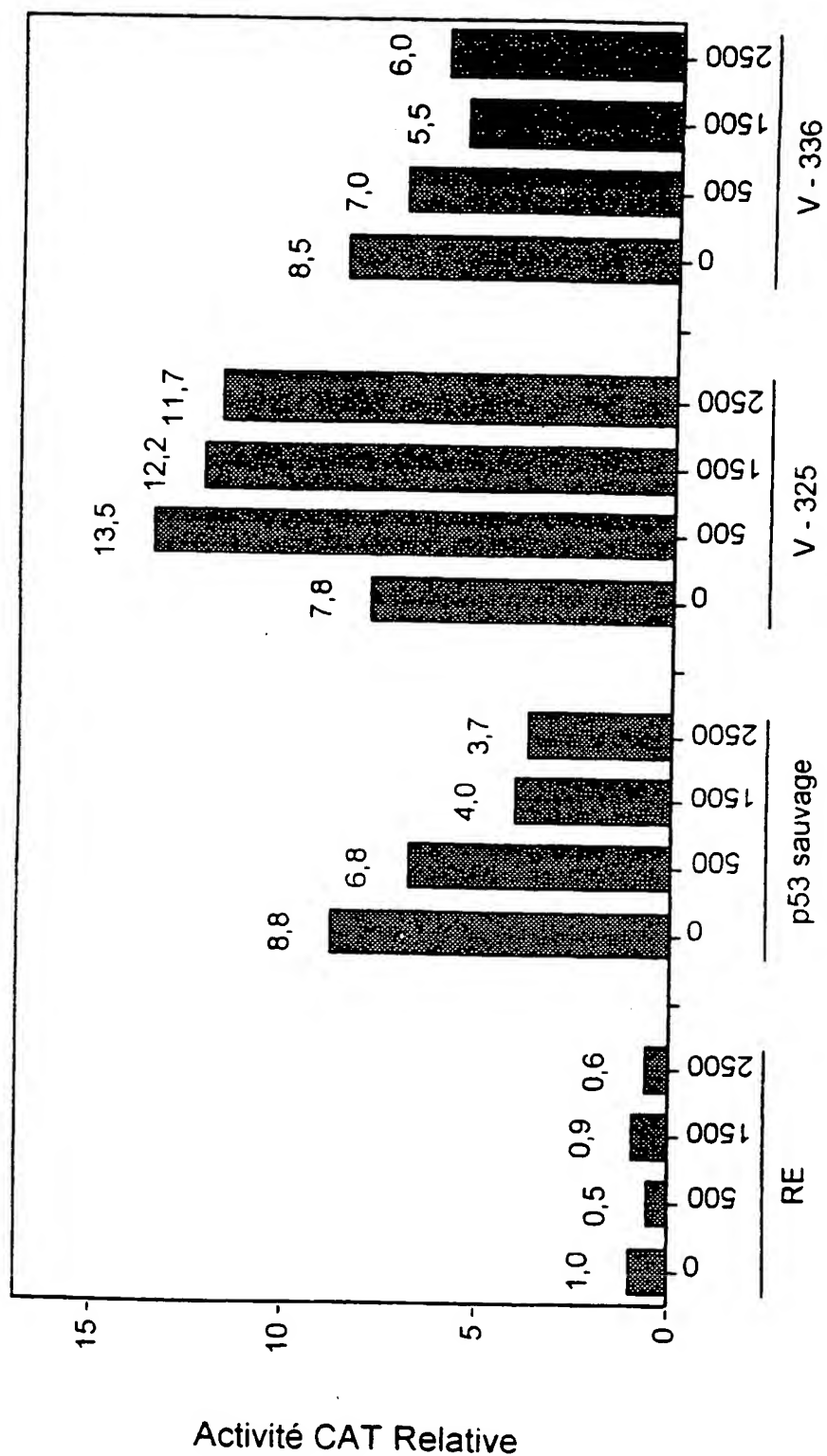


Figure 10

11/18



Quantité du vecteur pSV2-E6 (ng)

Figure 11

12/18

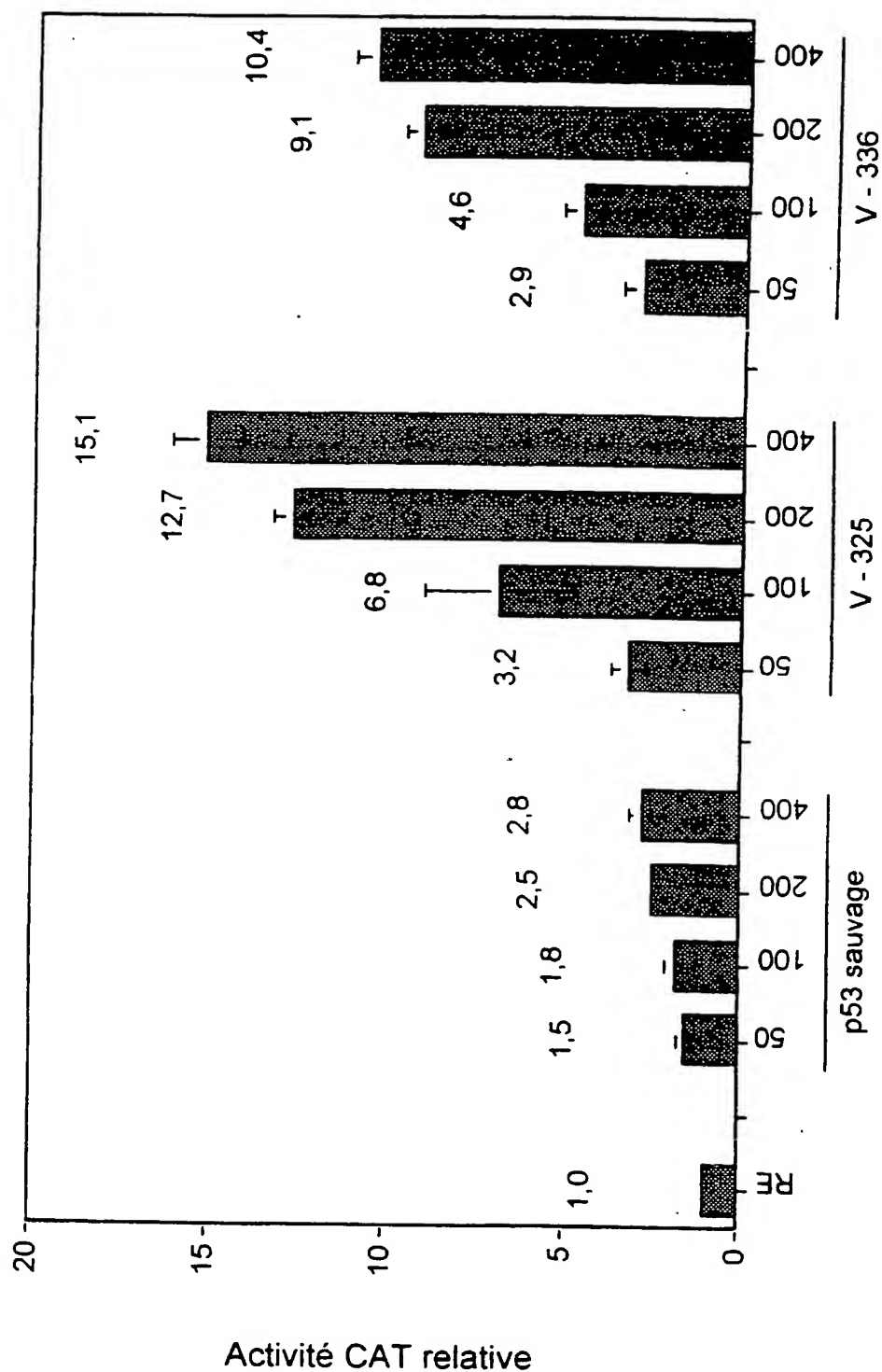
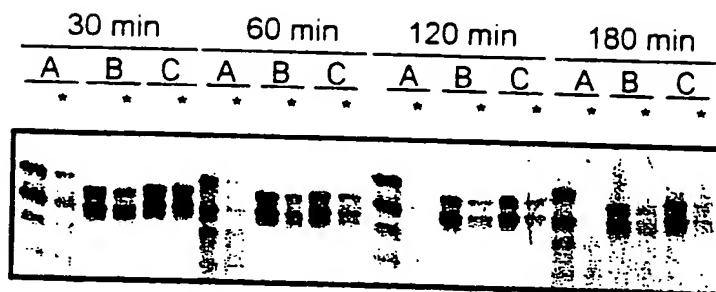
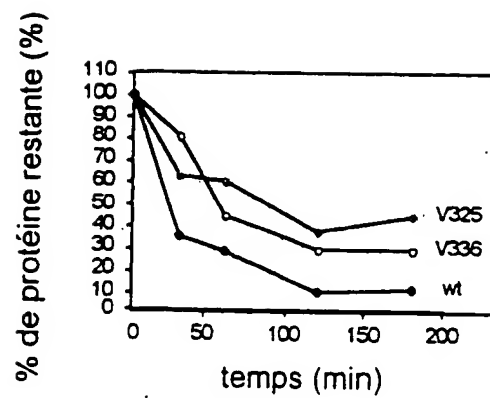


Figure 12

13/18



A: p53 sauvage / B: V-325 / C: V-336 / *: +E6

Figure 13

14/18

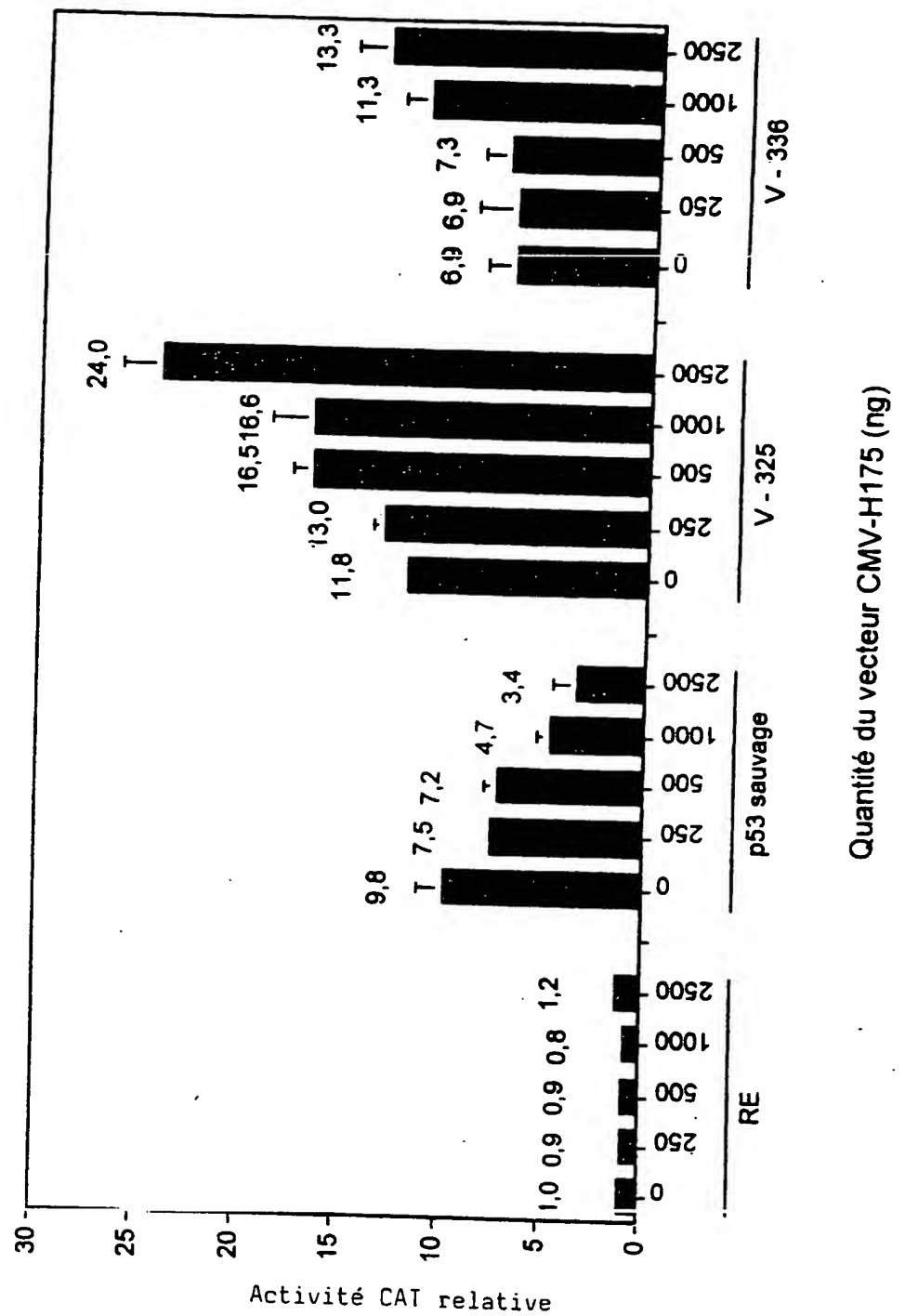


Figure 14

15/18

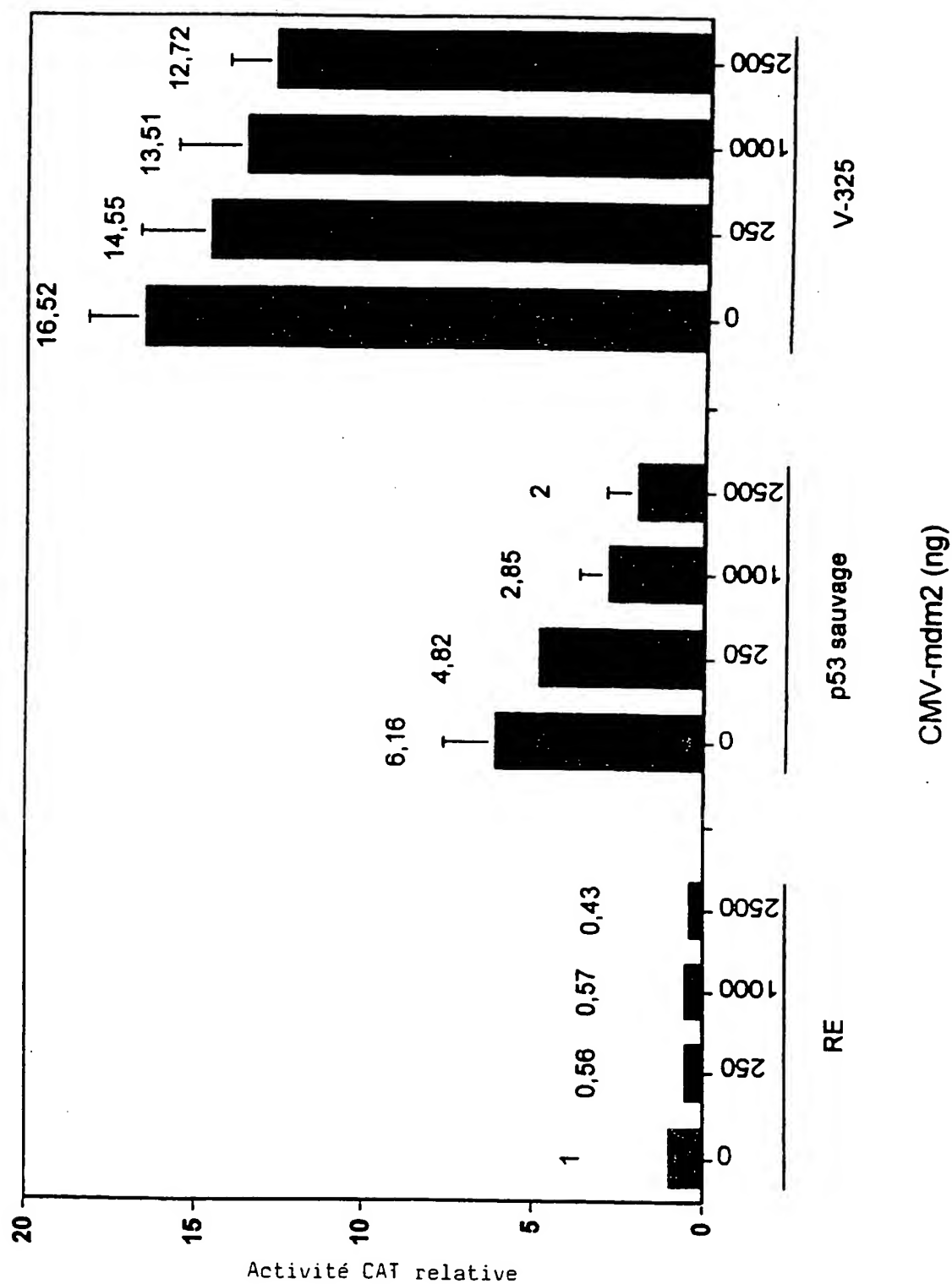


Figure 15

16/18

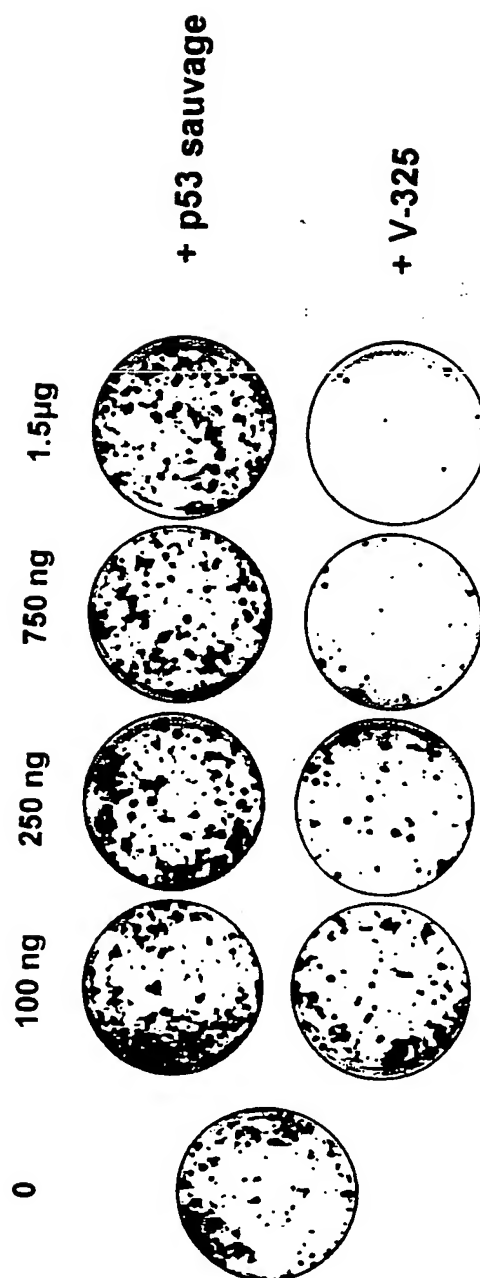


Figure 16

17/18

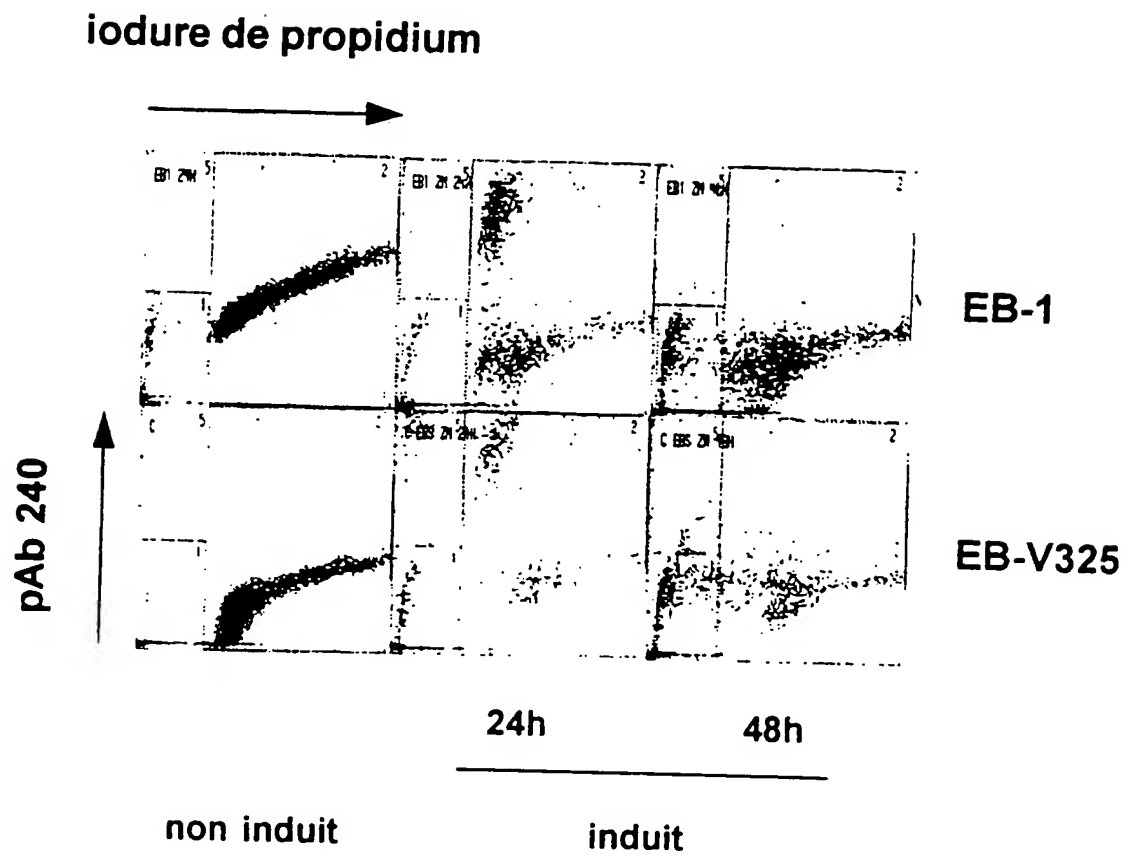


Figure 17

18/18

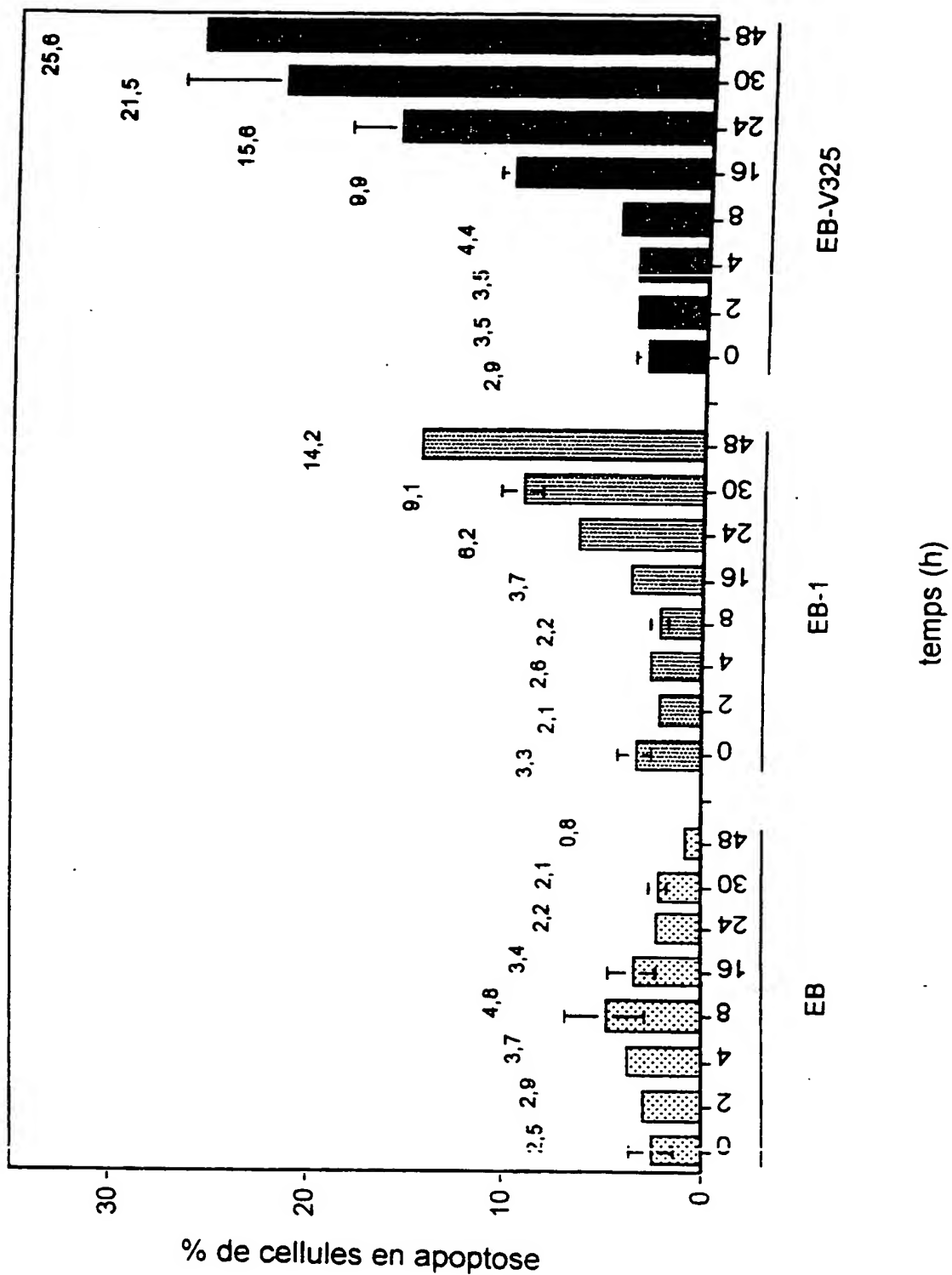


Figure 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/82 C12N15/62 C12N15/86 C07K19/00
 A61K38/16 A61K31/70 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, WASHINGTON US, pages 1998-2002, XP002019922 PIETENPOL, J. ET AL.: "Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53" cited in the application	1-5, 8-15,20, 24,25, 27-29, 40,41, 43,44,50
Y	see the whole document	3,21,22, 43-53

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 1996

Date of mailing of the international search report

11.12.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inⁿ tional Application No

PCT/FR 96/01111

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 11, WASHINGTON US, pages 6849-6857, XP002019923 BROWN, D. ET AL.: "The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein" see figure 2	3
Y	--- MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (1995 JAN) 15 (1) 497-504, XP000568946 WU, L. ET AL.: "Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids." see the whole document	21,22
Y	--- WO,A,95 09916 (RHONE POULENC RORER SA ;MALLET JACQUES (FR); REVAH FREDERIC (FR);) 13 April 1995 see page 4, line 11 - page 5, line 24	43-53
X	--- GENE EXPRESSION, (1993) 3 (1) 95-107, XP000611818 REED, M. ET AL.: "p53 domains: suppression, transformation, and transactivation." see figure 2 see 'Discussion'	24,25,27
A	--- WO,A,95 17213 (SLOAN KETTERING INST CANCER) 29 June 1995 see the whole document	24,25, 27-29, 40-53
A	--- WO,A,94 12202 (UNIV DUNDEE ;LANE DAVID PHILIP (GB); HUPP THEODORE ROBERT (GB)) 9 June 1994 see page 8, line 23 - page 9, line 5 see claims	13-19,53
A	--- WO,A,95 16771 (PHARMAGENICS INC) 22 June 1995 see page 9, line 4 - line 20 see example 1	3,4, 43-53
P,X	--- EMBO JOURNAL, 15 (14) 3693-701., 15 July 1996, XP002019925 ATTARDI, L. D. ET AL.: "Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis." see figure 1	1,2,5, 8-11, 24-29, 40,41, 43,44
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01111

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,96 16989 (WISTAR INST ;HALAZONETIS THANOS D (US)) 6 June 1996 see page 12, line 4 - page 14, line 10 see page 25, line 17 - page 26, line 27 see page 32, line 9 - page 37, line 6 see claims; figures; examples ---	1,5,8, 10,40, 41,43-53
L	SCIENCE, vol. 250, US, pages 1400-1403, XP002019926 HU, J. ET AL.: "Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions" * Document cité car il met en évidence que le domaine CC de GCN4 utilisé dans PNAS 91,1998-2002 est un leucine zipper * -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9509916	13-04-95	FR-A- 2710846	14-04-95
		AU-A- 7816294	01-05-95
		CA-A- 2173338	13-04-95
		EP-A- 0722496	24-07-96
		FI-A- 961494	03-04-96
		NO-A- 961220	26-03-96
WO-A-9517213	29-06-95	AU-A- 1440695	10-07-95
WO-A-9412202	09-06-94	AU-A- 5533194	22-06-94
		CA-A- 2150265	09-06-94
		EP-A- 0675729	11-10-95
		JP-T- 8505607	18-06-96
WO-A-9516771	22-06-95	CA-A- 2155930	22-06-95
		EP-A- 0682698	22-11-95
WO-A-9616989	06-06-96	US-A- 5573925	12-11-96
		AU-A- 4288496	19-06-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière de Internationale No
PCT/FR 96/01111

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/12 C07K14/82 C12N15/62 C12N15/86 C07K19/00 A61K38/16 A61K31/70 A61K48/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, WASHINGTON US, pages 1998-2002, XP002019922 PIETENPOL, J. ET AL.: "Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53" cité dans la demande	1-5, 8-15, 20, 24, 25, 27-29, 40, 41, 43, 44, 50
Y	voir le document en entier <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> --- - / - </div>	3, 21, 22, 43-53
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">2 Décembre 1996</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">11.12.96</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Andres, S</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der 1e Internationale No

PCT/FR 96/01111

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 11, WASHINGTON US, pages 6849-6857, XP002019923 BROWN, D. ET AL.: "The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein" voir figure 2	3
Y	--- MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (1995 JAN) 15 (1) 497-504, XP000568946 WU, L. ET AL.: "Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids." voir le document en entier	21,22
Y	--- WO,A,95 09916 (RHONE POULENC RORER SA ;MALLET JACQUES (FR); REVAH FREDERIC (FR);) 13 Avril 1995 voir page 4, ligne 11 - page 5, ligne 24	43-53
X	--- GENE EXPRESSION, (1993) 3 (1) 95-107, XP000611818 REED, M. ET AL.: "p53 domains: suppression, transformation, and transactivation." voir figure 2 voir 'Discussion'	24,25,27
A	--- WO,A,95 17213 (SLOAN KETTERING INST CANCER) 29 Juin 1995 voir le document en entier	24,25, 27-29, 40-53
A	--- WO,A,94 12202 (UNIV DUNDEE ;LANE DAVID PHILIP (GB); HUPP THEODORE ROBERT (GB)) 9 Juin 1994 voir page 8, ligne 23 - page 9, ligne 5 voir revendications	13-19,53
A	--- WO,A,95 16771 (PHARMAGENICS INC) 22 Juin 1995 voir page 9, ligne 4 - ligne 20 voir exemple 1	3,4, 43-53
P,X	--- EMBO JOURNAL, 15 (14) 3693-701., 15 Juillet 1996, XP002019925 ATTARDI, L. D. ET AL.: "Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis." voir figure 1	1,2,5, 8-11, 24-29, 40,41, 43,44
	--- -/--	

2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der -de Internationale No

PCT/FR 96/01111

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>WO,A,96 16989 (WISTAR INST ;HALAZONETIS THANOS D (US)) 6 Juin 1996</p> <p>voir page 12, ligne 4 - page 14, ligne 10 voir page 25, ligne 17 - page 26, ligne 27 voir page 32, ligne 9 - page 37, ligne 6 voir revendications; figures; exemples</p> <p>---</p>	<p>1,5,8, 10,40, 41,43-53</p>
L	<p>SCIENCE, vol. 250, US, pages 1400-1403, XP002019926 HU, J. ET AL.: "Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions" * Document cité car il met en évidence que le domaine CC de GCN4 utilisé dans PNAS 91,1998-2002 est un leucine zipper *</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs membres de familles de brevets

De demande internationale No

PCT/FR 96/01111

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9509916	13-04-95	FR-A- 2710846	14-04-95
		AU-A- 7816294	01-05-95
		CA-A- 2173338	13-04-95
		EP-A- 0722496	24-07-96
		FI-A- 961494	03-04-96
		NO-A- 961220	26-03-96
WO-A-9517213	29-06-95	AU-A- 1440695	10-07-95
WO-A-9412202	09-06-94	AU-A- 5533194	22-06-94
		CA-A- 2150265	09-06-94
		EP-A- 0675729	11-10-95
		JP-T- 8505607	18-06-96
WO-A-9516771	22-06-95	CA-A- 2155930	22-06-95
		EP-A- 0682698	22-11-95
WO-A-9616989	06-06-96	US-A- 5573925	12-11-96
		AU-A- 4288496	19-06-96